

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Maspinexpression und Angiogenese
beim Prostatakarzinom**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lambert Gierl

2011

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. MED. FERDINAND HOFSTÄDTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Maspinexpression und Angiogenese
beim Prostatakarzinom**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lambert Gierl

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. Andreas Gaumann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Edward Geissler

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Dezember 2011

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Epidemiologie und Ätiologie	5
1.2 Morphologie und Histologie	6
1.3 Klassifikation und Diagnostik	7
1.3.1. TNM-System	7
1.3.2. Grading nach Gleason	9
1.3.3. PSA-Wert	10
1.4 Angiogenese	11
2. Ziel der Untersuchung	15
3. Materialien	16
3.1 Chemikalien	16
3.2 Puffer und Substratlösungen	16
3.3 Antikörper, Antikörperkomplexe und Enzyme	18
4. Patienten und Methoden	22
4.1 Patienten	22
4.2 Vorbehandlung des Gewebes	22
4.3 Immunhistochemische Färbung der Schnitte	23
4.3.1 Prinzip der FVIII- und CD31-Färbung (ABC-Methode)	23
4.3.2 Prinzip der CD105-Färbung (Dako CSA-Kit)	23
4.4 Durchführung der Färbungen	25
4.4.1 Durchführung ABC/Peroxidase-Methode (FVIII)	25
4.4.2 Durchführung ABC/AP-Methode (CD31)	26
4.4.3 Durchführung DAKO CSA-Kit (CD105)	27
4.5 Mikroskopie und statistische Auswertung	27
5. Ergebnisse	29
5.1 Allgemeine Deskription	29
5.1.1 Evaluierung klinischer Parameter des untersuchten Patientenkollektivs	29
5.1.2 Beziehung zwischen rezidivfreiem und Gesamtüberleben und den klinischen Parametern bei dem untersuchten Patientenkollektiv	30

5.2 Morphometrische Auswertung der Tumervaskularisation	31
5.2.1 Mikrogefäßdichte der Prostatakarzinome (MVC)	31
5.2.2 Vaskuläre Gefäßfläche der Prostatakarzinome (VSA)	32
5.2.3 Abstände der Mikrogefäße der Prostatakarzinome (IVAS)	33
5.2.4 Beziehung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens mit den Gefäßparametern MVC, VSA, IVAS	34
5.3 Korrelation der Gefäßparameter MVC, VSA und IVAS für die Marker FVIII, CD31, CD105	37
5.4 Evaluierung der Maspinexpression bei Patienten mit Prostata- karzinomen	38
5.4.1 Ermittlung des rezidivfreien Überlebens und Gesamt- überlebens in Abhängigkeit von der Maspinexpression	38
5.4.2 Korrelation der Maspinexpression mit der Vaskularisa- tion anhand der ermittelten Gefäßparameter	38
Signifikante Graphen	40
Histologische Bilder	42
6. Diskussion	46
6.1. Die klinischen Parameter als Prognosefaktoren	46
6.2. Morphometrische Auswertung der Tumervaskularisation und Korrelation der Gefäßparameter	48
6.3. Maspinexpression und Korrelation mit Gefäßparametern und Überleben	52
7. Zusammenfassung und Ausblick	55
8. Tabellen	56
9. Literaturverzeichnis	66
Erklärung	83
Danksagung	84
Lebenslauf	85

Abkürzungsverzeichnis

• ABC	Avidin Biotin Complex
• A.d.	Aqua dest.
• Ak	Antikörper
• AP	Alkalische Phosphatase
• bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
• BPH	Prostatahyperplasie
• BCL	B-Cell Lymphoma
• BRCA	Breast Cancer
• BSA	Bovines Serum Albumin
• CHROM	Chromogen-Substratlösung
• CC	Korrelationskoeffizient
• CD	Cluster of differentiation
• CSA	Catalyzed Signal Amplification
• DAB	Diaminobenzidine
• DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
• DNA	Desoxyribonukleinsäure
• EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
• excl.	excluded
• F	Faktor
• FGF	Fibroblast Growth Factor
• G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
• HPC	Hereditary prostate cancer
• ID	Identifikationsnummer
• IgG	Immunglobuline der Klasse G
• IL	Interleukin
• IP	Interferon-inducible protein
• IRS	Insulinrezeptorsubstrat
• IVAS	Inter Vascular Distance
• HRP	Hormonrefraktäre Prostata
• LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
• MMP	Matrix Metalloproteinasen

• MVC	Micro Vessel Count
• MVD	Micro Vessel Density
• MW	Mittelwert
• PA	Primäraffekt
• PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
• PBS	Phosphate Buffered Saline
• PD-ECGF	Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor
• PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
• PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
• PF	Platelet Factor
• PIGF	Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein
• POX	Peroxidase
• PSA	Prostata-spezifisches Antigen
• RNA	Ribonukleinsäure
• RPE	Radikale Prostatektomie
• RT	Raumtemperatur
• SCCA	Squamous Cell Carcinoma Antigen
• TBST	Tris-Buffered Saline and Tween
• TGF- α /TGF- β	Transforming Growth Factor- α /- β
• TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
• TNM	Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall (Nodes), Metastasen
• TP	Thymidinphosphorylase
• TRIS/TRIZMA	Trishydroxymethylaminomethan
• TRS	Target Retrieval Solution
• UICC	Union Internationale Contre le Cancer
• ü.N.	über Nacht
• VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
• VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor
• VPF	Vascular Permeability Factor
• VSA	Vascular Surface Area
• vWF	von Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Mannes in den westlichen Industrienationen und die zweithäufigste Todesursache (1). Pro Jahr werden nach Angaben des Robert Koch-Instituts etwa 58.570 Neuerkrankungen in Deutschland diagnostiziert. Durchschnittlich erkrankt jeder siebte Mann im Laufe seines Lebens am Prostatakarzinom, wobei die Wahrscheinlichkeit, an einem Karzinom zu erkranken, mit zunehmendem Alter steigt. Autopsiestudien berichteten in 42% der untersuchten Männer von einem gesicherten Prostatakarzinom bei einer klinischen Identifikationsrate von nur 9,5%. Der hohe Anteil von klinisch nicht diagnostizierten Karzinomen kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass eins von zehn Karzinomen niemals klinisch manifest wird (2). Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes kann folgende Einteilung erfolgen: Das inzidentelle Karzinom wird als Zufallsbefund diagnostiziert und ist klinisch noch nicht in Erscheinung getreten. Auch das latente Karzinom kann klinisch nicht nachgewiesen werden und wird erst bei der Obduktion gefunden, während beim okkulten Karzinom der Primärtumor zunächst noch unbekannt ist und erst aufgrund von Metastasen auffällig wird. Das klinisch manifeste Prostatakarzinom ist mit weitem Abstand die häufigste Kategorie; es wird auf Grund symptomatischer Beschwerden des Patienten oder bei der Vorsorgeuntersuchung nachgewiesen (3).

Die Häufigkeit der Prostatakarzinome variiert sehr stark in den unterschiedlichen Regionen der Erde: Während in Japan die Inzidenzrate mit 1–7 pro 100.000 Männern pro Jahr sehr gering ist, weist die USA den höchsten Wert auf. Die Inzidenzrate für Weiße in den USA liegt bei 185 pro 100.000 Männern, für Afro-Amerikaner bei 234 pro 100.000 Männern pro Jahr (4). Hierfür werden vor allem genetische Unterschiede der verschiedenen ethnischen Gruppen verantwortlich gemacht.

Als weitere Ursachen für Prostatakarzinome werden Umweltfaktoren wie z.B. Luftverschmutzung und landesspezifische Essgewohnheiten, v.a. der Konsum tierischer Eiweiße und Fette, die wahrscheinlich zur Karzinogenese des Prostatakarzinoms beitragen, diskutiert (5).

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe des Testosteronspiegels im Serum sowohl das Fortschreiten als auch die Entstehung von

Prostatakarzinomen beeinflussen könnte (6). Direkte endokrinologische und biochemische Untersuchungen konnten bisher aber keinen Nachweis dafür liefern, dass bei Prostatakrebspatienten spezifische hormonelle Faktoren vorherrschen. Außerdem soll der Zeitpunkt der Pubertät und die sexuelle Aktivität das Karzinomrisiko beeinflussen (5).

Aus früheren Studien geht hervor, dass zumindest ein Teil der Prostatakarzinome autosomal dominant vererbt wird. So steigt die Wahrscheinlichkeit für einen Mann an einem Prostatakarzinom zu erkranken erheblich, wenn ein oder mehrere Familienmitglieder bereits daran erkrankt sind oder waren (7). Für das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, ist auch entscheidend, ob es sich dabei um einen Verwandten ersten oder zweiten Grades handelt. Abhängig davon schwankt das Karzinomrisiko zwischen dem 1,7-fachen und 11-fachen Risiko (7). Diesbezüglich wurde kürzlich in Familien mit gehäuftem Auftreten von Prostatakarzinomen ein Gen lokalisiert (HPC1), das mit der Krankheit gekoppelt ist. Außerdem ist auch bei Trägern des Brustkrebsgens BRCA1 das Prostatakrebsrisiko erhöht.

1.2. Morphologie und Histologie

Die Prostata ist eine exokrine Drüse unterhalb der Harnblase, welche die männliche Harnröhre (Urethra) umschließt. Sie gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und produziert das Prostatasekret, einen Teil der Samenflüssigkeit.

Die Prostata ist etwa kastaniengroß, wiegt rund 20g und weist einen festen, teils glandulären, teils muskulären Körper auf. Die äußere Form ist annähernd pyramidenförmig, wobei die Basis zur Harnblase, der Apex nach kaudal weist. Die Prostata besteht aus etwa 30-40 tubulo-alveolären Einzeldrüsen, deren Ausführungsgänge (ductus prostatici) rund um den Samenhügel (Colliculus seminalis) in die Pars prostatica der Harnröhre münden. Makroskopisch erscheint das Tumorgewebe markig-gelblich und homogener als das umgebende Prostatagewebe (8), es lässt sich aber meist nicht sicher abgrenzen.

Die Prostata lässt sich in drei Zonen gliedern, die sich in etwa wie Zwiebelschalen um die zentral verlaufende Harnröhre legen: Periurethrale Mantelzone, Innenzone und Außenzone. Die periurethrale Mantelzone ist die kleinste Zone, welche die Harnröhre umgibt und etwa 5-10% der Prostatamasse darstellt. In der trichterförmigen Innenzone, die etwa 20-25% der Drüse enthält, verläuft der Spritzkanal (ductus ejaculatorius). Die Außenzone bildet mit ca. 70% Masse den Hauptteil der Prostata.

Histologisch handelt es sich in etwa 97% der Prostatakarzinome um ein Adenokarzinom. Sie gehen von den peripheren Drüsenanteilen der glans prostatae aus. Zu den Kennzeichen des Tumors zählen die Neigung zu multizentrischem Wachstum sowie das Vorkommen verschiedener histologischer Wachstumsmuster. Diese Ausprägungen beinhalten Formen des niedrig bis hoch differenzierten, des kribiformen oder soliden Karzinoms. Sonderformen sind z.B. das endometroide Karzinom, das Karzinom der Transitionalzellzone, das Plattenepithel-, das adenoid-zystische Karzinom oder mehr Formen.

Aufgrund der speziellen Wachstumseigenschaften des Prostatakarzinoms unterscheidet man eine frühe und eine späte Phase der Ausbreitung. In der frühen Phase befindet sich der Tumor entsprechend seiner Ausgangslokalisation vor allem in den peripheren Bereichen der Prostata, während die intraprostatistische Ausbreitung der späten Phase zugeordnet wird. Auf diese Weise kommt es besonders im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit zu Harnwegsobstruktionen. Davon zeitlich unabhängig erfolgt die Kapselpenetration, sowie die Samenblasen- und Harnblasenbodeninfiltration (9).

1.3. Klassifikation und Diagnostik

1.3.1. TNM-System

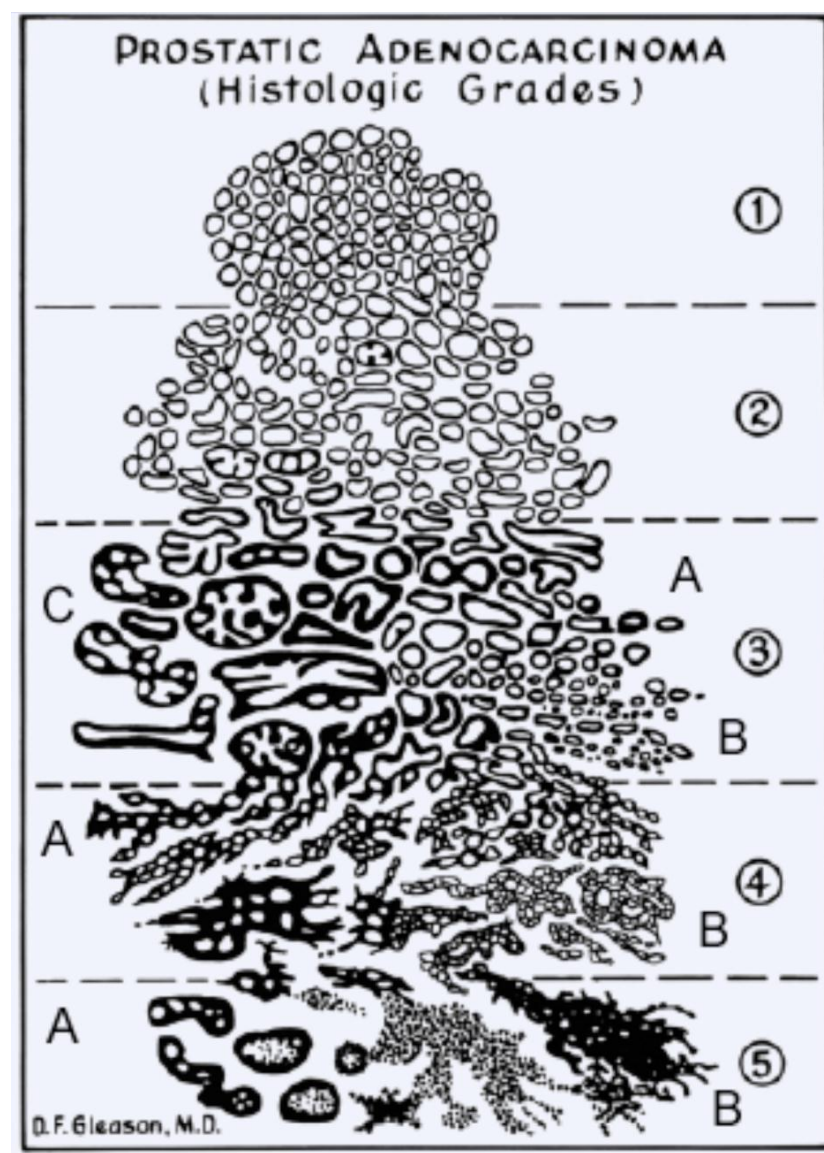
Das Staging des Prostatakarzinoms erfolgt anhand der aktuellen UICC-Klassifikation (7. Auflage 2010). Hierbei werden Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) berücksichtigt:

Stadium	
T	Primärtumor
TX	Keine Beurteilung möglich
T1	Klinisch inapparenter Tumor
T1a	inzidenteller Tumor in $\leq 5\%$ des resizierten Gewebes
T1b	inzidenteller Tumor in $\geq 5\%$ des resizierten Gewebes
T1c	Tumor identifiziert durch Biopsie
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt
T2a	Tumor in einer Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor in mehr als einer Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor organüberschreitend
T3a	Tumor durchbricht die Kapsel (uni- oder bilateral)
T3b	Tumor infiltriert die Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert Blasenhal, äußeren Sphincter, Rektum, Levatormuskeln oder Beckenwand
N	Nodalstatus
NX	Keine Beurteilung möglich
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
MX	Keine Beurteilung möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	nicht-regionale Lymphknotenmetastasen
M1b	Knochenmetastase(n)
M1c	Andere Fernmetastasen

(Wittekind Ch: UICC TNM classification of malignant tumours ((10))

1.3.2. Grading nach Gleason

Mitte der sechziger Jahre wurde von dem amerikanischen Pathologen Donald F. Gleason ein System zur histologischen Beurteilung von Prostatakarzinomen entwickelt. Hierbei erfolgt eine Einteilung in fünf Grade, wobei Grad 1 die am besten differenzierten Tumoren beschreibt und Grad 5 die am schlechtesten differenzierten Tumoren, deren Wachstumsmuster fast jede Ähnlichkeit mit normalem Prostatagewebe verloren haben. Die Grade 2 bis 4 liegen dazwischen (11).



(Gleason D: Classification of prostate carcinomas (129))

Der *Gleason Score* beinhaltet die Beurteilung des Wachsmusters der atypischen Prostatadrüsen. Dabei wird die Summe des häufigsten und zweithäufigsten

“*Patterns*” als *Gleason Score* angegeben, wobei der erste Grad immer das vorherrschende Wachstumsmuster beschreibt. Das *Pattern* 4-5 werden nochmals in A und B bzw. das *Pattern* 3 von A-C unterteilt. Falls nur ein Wachstumsmuster vorliegt wird der Grad verdoppelt, ansonsten die beiden Werte addiert, so dass sich ein Score zwischen 2 und 10 ergibt. Je niedriger der *Gleason Score* ist desto besser ist das Prostatakarzinom differenziert (12). Daraus ergibt sich folgende Einteilung:

- Tumore mit einem Score von 2 bis 4: hochgradig differenziert
- Tumore mit einem Score von 5 bis 7: mittelgradig differenziert
- Tumore mit einem Score von 8 bis 10: geringgradig differenziert

1.3.3. PSA-Wert

Das Prostata-spezifische Antigen ist ein Glykoprotein aus 237 Aminosäuren mit einer Größe von 28kDa (13). Die Produktion findet in den Drüsenepithelien der Prostata statt (14). Das PSA ist zwar hoch sensitiv und weitestgehend spezifisch für die Prostata, jedoch nicht spezifisch für das Prostatakarzinom (15,16,17). Weil normale sowie hyperplastische als auch neoplastische Epithelien PSA bilden, kann ein erhöhter PSA-Wert ebenso durch ein Karzinom wie auch durch eine benigne Prostatahyperplasie (BPH) oder eine Prostatitis bedingt sein (18). Dennoch wird der PSA-Wert als sehr geeigneter Marker zur Erkennung von Prostatakarzinomen eingesetzt.

Durch Entzündungen, Manipulationen (z.B. Biopsie) oder Zelltod kommt es zum Verlust der intraprostatatischen Barriere und damit zu einem Anstieg des Serum-PSA Spiegels (19). Der Nachweis erfolgt dann mittels mono- und polyklonaler Antikörper, die sich gegen bestimmte Epitope des PSA-Proteins richten. Aktuell wird ein Serum-PSA-Wert von weniger als 4ng/ml als nicht pathologisch angesehen, wobei auch eine Senkung des Schwellenwertes auf 3ng/ml diskutiert wird. Bei der Beurteilung eines PSA-Wertes muss auch das Alter eines Patienten berücksichtigt werden, weil mit zunehmendem Alter auch der PSA-Wert steigt:

Altersgrenzen	
Alter (Jahre)	PSA-Obergrenze (ng/ml)
40-49	2,5
50-59	3,5
60-69	4,5
70-79	6,5

(Oesterling JE: Zusammenhang zwischen Alter und PSA (20))

Der PSA-Wert gilt zwar als recht zuverlässig und besitzt die höchste Voraussagewahrscheinlichkeit aller Parameter, er erweist sich dennoch aus diagnostischer Sicht als teilweise unsicher: So weisen 11-29% der Männer mit gesichertem Prostatakarzinom kein erhöhtes PSA auf. Außerdem werden in vielen Fällen klinisch nicht signifikante Karzinome entdeckt, die keine prognostische Bedeutung für den Patienten haben und ohne PSA-Test nicht entdeckt worden wären (21). Der Anteil derartiger Überdiagnostizierungen beträgt ca. 27-56% (22). Aus diesen Gründen wird weiterhin in zahlreichen Studien nach neuen und zuverlässigen Markern bzw. Tests geforscht, wobei bisher die meisten keine ausreichend hohe Spezifität aufweisen (15).

1.4. Angiogenese

Angiogenese, die Neubildungen von Kapillargefäßen, ist ein biologischer Prozess, welcher essentiell für bestimmte physiologische Vorgänge, aber auch für das Wachstum bösartiger Tumoren ist (23).

Die gefäßwandauskleidenden Endothelzellen gehören normalerweise zu den am seltensten sich teilenden Zellen des menschlichen Körpers (24). Sie stehen unter ständiger Kontrolle von endogenen Angiogenesestimulatoren wie z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und endogenen Angiogeneseinhibitoren wie z.B. Thrombospondin-1 und Platelet

Factor 4 (PF4). Unter physiologischen Bedingungen stehen diese Faktoren in einem Gleichgewicht, die sog. angiogene Balance (25).

Durch Entartung von Körperzellen bildet sich ein unkontrolliert teilender Zellklon, der allmählich zu einem Tumor heranwachsen kann (25). Dieser befindet sich zunächst noch in der avaskulären Phase, bildet also noch keine eigenen Blutgefäße aus (angiogenes Gleichgewicht). Die Tumorzellen werden noch mittels Diffusion ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Sobald der Tumor jedoch eine bestimmte Größe überschreitet werden die Diffusionsstrecken zu lang, so dass diese Versorgung nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Ein weiteres Wachstum ist also nur durch Angiogenese möglich (26). Zellklone, die zu klinisch relevanten Tumorerkrankungen heranwachsen, durchlaufen an dieser Stelle den sog. „angiogenen switch“ (25,27), es erfolgt also der Übergang von der avaskulären in die vaskuläre, angiogenetische Phase.

Zu Beginn dieser „angiogenen Kaskade“ kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen durch verschiedene Zellmitogene, unter anderem VEGF, TGF- α , PDGF oder bFGF (28). Besonders hervorzuheben ist hierbei das multifunktionelle Zytokin VEGF, das auch durch Hypoxie induziert werden kann (29). Es bindet an Flt-1- (VEGFR-1), Flk-1- (KDR), und Flt-4- (VEGFR-3) Rezeptoren, wobei für die Tumorangiogenese v.a. der KDR-Rezeptor von wesentlicher Bedeutung ist, weil er für die Teilung und Migration der Endothelzellen und damit der Neubildung von Gefäßen unter pathologischen Bedingungen verantwortlich ist (30,31). Dadurch kommt es zu einer Dilatation und Permeabilitätssteigerung der Kapillaren. Durch Bindegewebsfibroblasten werden anschließend Proteasen freigesetzt, welche die Auflösung der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran bewirken. Somit können nun Endothelzellen in die Richtung des angiogenen Stimulus wandern. An der Spitze dieser Migrationssäule beginnen die Endothelzellen unter dem Einfluß von Angiogenesefaktoren zu proliferieren. Somit kommt es allmählich zur Bildung neuer Kapillaren, durch welche die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff bis ins Tumorzentrum sicher gestellt werden kann (32). Da die Endothelzellen selbst eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren freisetzen können, wie z.B. VEGF oder bFGF, haben die neu gebildeten Kapillaren nicht nur einen nutritiven Effekt, sondern stimulieren zusätzlich die Tumorzellproliferation (33). Die Steuerung der Angiogenese erfolgt durch viele Regulationsmoleküle. Eine Einteilung kann in positive oder negative Regulatoren erfolgen:

Positive Regulatoren	Negative Regulatoren
<ul style="list-style-type: none"> - Angiogenin - EGF/TGF-α - FGF's-1, -2, -3 - G-CSF - Hypoxie - IL-8 - PDGF-BB - PIGF - Proliferin - Prostaglandine - TGF-β - Thymidine Phosphorylase/PD-ECGF - tissue factor - TNF-α - VEGFs/VPF 	<ul style="list-style-type: none"> - Angiostatin - C-X-X Chemokine: PF 4; IP-10; groß - Hyaluronidase - IL-12 - Interferone - MMP & PA Inhibitoren - 16Kd prolactin fragment - Retinoide - Ribonuklease Inhibitoren - TGF-β - Thrombospondin - TNF-α

(Pepper MS: Regulatoren der Angiogenese (34))

Diese Einteilung konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden: So konnte z.B. Mazzucchelli zeigen, dass die Konzentration von VEGF im Prostatakarzinomgewebe deutlich höher liegt als in normalem Prostatagewebe (35). Eine weitere Studie stellte erhöhte Serumlevel für bFGF bei Patienten mit einem Prostatakarzinom in Vergleich zu Kontrollpersonen fest (36). Ein Molekül, das als besonders wichtig für die Angiogenese angesehen wird, nämlich PD-ECGF, konnte vor allem in Gewebe mit hoher Gefäßdichte und hohem *Gleason Score* nachgewiesen werden (37).

Als weiterer Angiogeneseinhibitor gilt Maspin. Es zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Serin-Proteasen-Inhibitoren, unterscheidet sich aber in der Wirkung von klassischen Proteasen-Inhibitoren (38). Es hemmt die zelluläre Invasion, Motilität und Proliferation in gesunden Geweben. In verschiedenen Studien konnte die Funktion von Maspin als Angiogeneseinhibitor bestätigt werden: So konnten Machtens et al. nachweisen, dass die verminderte Expression von Maspin im Prostatakarzinomgewebe mit einer erhöhten Vaskularisation und einer Verschlechterung der Prognose einhergeht (39). Zu gleichen Ergebnissen führten

weitere Untersuchungen an Mammakarzinomen (40, 41, 42) sowie an humanem Kolon-, Magen-, Dünndarm-, Endometrium-, Hoden- und Thymus-Gewebe (38). Bisher fanden die meisten Studien über Maspin *in vitro* statt, so dass die genaue Wirkung noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Dennoch könnte Maspin wegen seiner anti-angiogenen Eigenschaften in Zukunft eine Rolle bei neuen Therapieverfahren von Tumoren spielen (43).

Neben der Expression von positiven sowie negativen Regulatoren kann die Angiogenese auch durch eine Untersuchung der Mikrogefäßdichte (MVD) eines Tumors untersucht werden. Weidner et al. konnten bereits in früheren Studien beweisen, dass die Mikrogefäßdichte beim Prostatakarzinom in engem Zusammenhang mit den histologischen und klinischen Eigenschaften des Tumors steht, wie z.B. *Gleason Score* oder das Vorhandensein von Metastasen (44). Es wurde auch nachgewiesen, dass eine Zunahme der Gefäßdichte mit einer Verschlechterung der Prognose korreliert: Bei Tumoren hoher Gefäßdichte fand eine Metastasierung früher statt (45) als bei Tumoren geringer Gefäßdichte (46).

Es wird vermutet, dass auch beim Prostatakarzinom durch eine Untersuchung der Mikrogefäßdichte Aussagen über die Prognose des Tumors hinsichtlich Aggressivität und Entwicklung getroffen werden können. Diese These konnte in früheren Studien sowohl belegt (47, 48) als auch widerlegt (49, 50) werden.

2. Ziel der Untersuchung

In dieser Studie soll anhand des Prostatakarzinoms die Hypothese überprüft werden, ob sich mit Hilfe der Angiogenese die Prognose von Karzinomen beurteilen lässt (32). Zu diesem Zweck erfolgte eine Korrelation der Vaskularisation mit der Maspinexpression und -progression.

Areale größter Gefäßdichte, sog. *hot spots*, wurden durch ein Lichtmikroskop zunächst erfasst und anschließend digitalisiert. Danach erfolgte die Erfassung der drei morphometrischen Parameter (Gefäßanzahl, Gefäßabstände, Gefäßflächen) und deren statistische Auswertung. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden abschließend mit den wichtigsten prognostischen Parametern wie *Gleason Score*, Höhe des Prostata spezifischen Antigens (PSA), Tumorstaging, Tumorigrading verglichen, ebenso mit Maspinexpression und -progression sowie anderen klinischen Daten wie z.B. Alter, Anamnese oder dem Auftreten von Rezidiven.

3. Materialien

3.1. Chemikalien

1. Aceton pro analysi (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland), 32201
2. Aquatex[®] (Merck, Darmstadt, Deutschland)
3. BSA (Bovines Serum Albumin) (SIGMA), A-7638
4. DAB (Di-amino-benzidine) (SIGMA), D-5637
5. Di-Natrium-hydrogenphosphat (Merck), 5104.100
6. EDTA (ethylen-di-amin-tetra-acetic acid) (SIGMA), E-5134
7. Ethanol, vergällt
8. Häkalaun nach Mayer (Hämatoxyllin)
9. Kaliumchlorid (Merck), 5189
10. Kalium-dihydrogenphosphat (Merck), 4873.5000
11. Levamisol (SIGMA), L-9756
12. Methanol (Merck), 1.06008.1006
13. Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 3957.2
14. HCl (Salzsäure) 37%ig (Merck), 1.00317.1000
15. Tri-Natriumcitrat Dihydrat (Roth), 3580.1
16. TRIS (Trishydroxymethylaminomethan; Roth), 4855.2
17. TRIZMA[®] (Trispuffer) Hydrochloride (SIGMA), T-3253
18. H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) 30%, (Merck), 1.08597.1000
19. Xylol
20. Ziegenserum (DAKO Ziegenserum X0907)

3.2. Puffer und Substratlösungen

21. AP-Substratlösung:

AP-Substrattablette (in APAAP Kit enthalten) in 2ml Trispuffer (0,1mol/l, pH 8,2, in APAAP Kit enthalten) lösen und unmittelbar vor Gebrauch filtern

22. Blockierungs-Lösung (ABC/Pox-Methode):

100ml Methanol + 4ml 30%ige H₂O₂

23. BSA/PBS bzw. BSA/TRIS 1%:

0,5g BSA in 50ml PBS bzw. TRIS-Puffer (pH 6,7) lösen

24. Formalinlösung (4%ig gepuffert):

4g NaH_2PO_4 + 6,5g Na_2HPO_4 + 100ml Formalin (35%ig) + 900ml aqua bidest.

25. Phosphat-Puffer (Phosphate Buffered Saline [PBS-Puffer]) (pH 7,4):

10-fach konzentrierte Lösung:

8,7g Natriumchlorid + 0,2g Kaliumchlorid + 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat + 1,15g di-Natriumhydrogenphosphat ad 100ml aqua bidest; pH 7,4 einstellen

Gebrauchslösung: konzentrierte Lösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen und pH-Wert (7,4) kontrollieren

26. Reagens A (Streptavidin)

1mL Streptavidin in 0,01mol/L phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, 15mmol/L NaN_3 , pH 7,2

27. Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)

1mL biotinylierte Meerrettich-Peroxidase in 0,01mol/L phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, 15mmol/L NaN_3 , pH 7,2

28. Streptavidin-Biotin Komplex:

1ml Aliquot Puffer in 5ml Teströhrchen geben (für 10 Objektträger)

Für je 1ml Puffer einen Tropfen Reagenz A und einen Tropfen Reagenz B zugeben und mischen

29. TRIS-Puffer (pH 7,6) Stammlösung:

8,78g Natriumchlorid + 6,85g $\text{TRIZMA}^{\text{®}}$ HCl + 0,9g TRIS ad 1000ml aqua bidest. pH 7,6 einstellen

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen

30. Trypsinlösung:

300mg Trypsin + 300 mg CaCl_2 in 300ml 0,05 molarem TRIS-Puffer lösen und auf pH 7,8 einstellen

3.3. Antikörper und Antikörperkomplexe

von Willebrand Faktor:

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein mit multimerer Struktur und einer relativen Molekülmasse von 500kDa bis hin zu mehr als 10.000kDa. Damit zählt er zu den größten löslichen Plasmaproteinen des Menschen (51). Das primäre Produkt des auf Chromosom 12p13.2 lokalisierten von Willebrand Faktor-Gens ist ein Protein, das aus 2813 Aminosäuren besteht. Dieses besteht aus einem Signalpeptid mit 22 Aminosäuren, einem Propeptid mit 741 Aminosäuren und einem maturen vWF-Molekül mit 2050 Aminosäuren (52). Die Expression erfolgt gewebespezifisch und ist auf Endothelzellen und Megakaryozyten begrenzt (51). Der vWF dient im Plasma als Träger für den Faktor VIII und schützt das für die Koagulation verantwortliche Coenzym gegen proteolytischen Abbau. Außerdem ist er bei Gefäßwandläsionen für Thrombozytenadhäsion und -aggregation mitverantwortlich. Zusätzlich kommt vWF auch in den Weibel-Pallade-Korpuskeln der Endothelzellen, im α -Granulum der Megakaryozyten und den hieraus entstehenden Thrombozyten sowie in der subendothelialen Matrix der Gefäßwand vor. Er stellt damit einen idealen Marker für Endothelzellen bzw. Gefäßwände dar (45).

Zur immunhistochemischen Detektion des Antigens wurde ein polyklonaler Antikörper (Polyclonal Rabbit, Anti Human, von Willebrand Faktor) der Firma DakoCytomation verwendet. Er liegt als gereinigte Immunglobulinfraktion des Kaninchen Anti-Serums in flüssiger Form vor in 0,1mol/L NaCl und 15mmol/L NaN_3 .

Endoglin (CD105)

Endoglin, auch als CD105 bezeichnet, ist ein homodimeres, transmembranöses Glykoprotein vom Typ I mit einem Molekulargewicht von 180kDa (53). Der für das Protein codierende Genlocus ist auf dem Chromosom 9q33-34 lokalisiert (54). Die Expression erfolgt *in vitro* von proliferierenden Endothelzellen und *in vivo* von Arterien, Venen und Kapillaren (55). Des Weiteren wird Endoglin auch von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und von einem Teil der

hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert (56, 57). Endoglin ist Teil des nicht signalübertragenden TGF-Rezeptorkomplexes (transforming growth factor) und bindet mit hoher Affinität TGF- β -1 und - β -3 - nicht jedoch TGF- β -2 (57, 58).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass v.a. Blutgefäße wachsender Tumoren stark positiv für CD105 sind (59, 55, 60, 61, 62). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass sich CD105 Antikörper im Gegensatz zu panendothelialen Markern vorzugsweise an aktivierte Endothelzellen, welche an der Tumorangio-genese beteiligt sind, binden und deshalb eine größere Spezitivität für die Neoangiogenese aufweisen (59, 63).

Zur Darstellung der Tumorgefäßdichte wurden monoklonale Antikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human, CD105, Endoglin Clone Sn6h) der Firma DakoCytomation verwendet. Sie liegen als murine monoklonale Antikörper als Gewebekulturüberstand (mit fetalem Rinderserum) in flüssiger Form vor, dialysiert gegen 0,05mol/L Tris-HCl, pH 7,2, und mit 0,015mol/L Natriumazid.

CD31 (PECAM, Platelet endothelial cell adhesion molecule)

CD31 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und ist ein Einketten-Transmembranprotein vom Typ 1 mit einer relativen Molekülmasse von ca. 135kDa.

CD31 geht homophile als auch heterophile Bindungen ein. Die homogene Bindungsstelle dient der transendothelialen Diapedese und Passage von Leukozyten durch die extrazelluläre Membran. Dabei resultiert die Ligation von CD31 an die Oberflächen von Leukozyten. Die heterogenen Anteile enthalten Integrine $\alpha_v\beta_3$, Heparin und Heparansulfat-Glykosaminoglykane. Deren Interaktion spielt eine gesonderte Rolle bei der Migration von Monozyten durch die Basalmembran des Subendothels (64).

Die Expression erfolgt auf allen Endothelzellen, einschließlich denen von Arterien, Arteriolen, Venen, Venolen und nicht sinusoiden Kapillaren. Außerdem wird CD31 auch geringfügig auf den Oberflächen von Mega-karyozyten, Thrombozyten,

Myeloidzellen, natürlichen Killerzellen und einigen Vorläufern von T-Zellen sowie auf den Vorläufern von B-Zellen exprimiert (64).

Im Gegensatz zum Antikörper gegen Faktor VIII, der kleinste Kapillaren nicht markiert, färbt der CD31-Antikörper eindeutig mehr Gefäße, vor allem mehr vaskuläre Strukturen an. Er ist der sensitivste panendotheliale Antikörper, mit dem die meisten Gefäße erkannt werden können, zeichnet sich aber nachteilig durch reduzierte Spezifität aus, da auch Reaktionen mit Plasmazellen zu beobachten sind (65).

Ein monoklonaler Antikörper der Firma DakoCytomation (Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, Clone JC70A) wurde zur immunhistochemischen Detektion von CD31 verwendet. Er wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand verwendet und wurde gegen 0,05mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15mmol/L NaN_3 .

Maspin

Maspin ist ein neuer Serin-Proteasen-Inhibitor, der zur Familie der Serpine gehört und ursprünglich durch subtraktive Hybridisierung in normalen Mammapithelzellen identifiziert wurde (42). Das entsprechende Gen befindet sich auf dem Chromosom 18q21.3-q23 in Nachbarschaft zum Plasminogen-Aktivator Inhibitor-2 (PAI-2), dem Onkogen BCL-2 und den Tumorsuppressorgenen DCC und SCCA 1 und SCCA 2 (42, 66). Maspin weist eine relative Molekülmasse von 42kDa auf und besteht aus 2584 Nukleotiden (67). Das Protein findet sich im Zytoplasma, im Zellkern und auf der Zelloberfläche (68).

Der genaue Mechanismus von Maspin auf die Tumorzellen ist noch unbekannt. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen ergaben eine hemmende Wirkung von Maspin auf Tumorzellinvasion und Metastasierung (42). So konnte Zou et al. nachweisen, dass eine abnehmende Expression von Maspin mit steigendem Malignitätsgrad und verschlechterter Prognose bei fortgeschrittenen Mamma- und Prostatakarzinomen einhergeht (42).

Es wurde festgestellt, dass die unterschiedliche Expression von Maspin in normalem Brustepithel und Brusttumoren nicht auf eine Veränderung des Genoms

der DNA zurückzuführen ist, sondern auf regulatorische Veränderungen auf der Transkriptionsebene (mRNA). In diesem Punkt unterscheidet sich Maspin von den klassischen Tumorsuppressorgenen (z.B.: p53, Retinoblastom) und kann somit den sog. Klasse II Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden. Diese gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie in Zukunft evtl. im Sinne einer Re-Expression des Maspin-Gens bei medikamentösen (Gen-)Therapien eingesetzt werden können (40).

Zur immunhistochemischen Detektion des Maspin-Antigens wurde ein monoklonaler Antikörper (Clone 167-70, Verdünnung 1:1000) der Firma BD (Becton Dickinson, Pharmingen, Heidelberg) verwendet (69).

Sekundärantikörper:

- a) biotinylierter goat anti-rabbit IgG Vectastain (Linaris, Weinheim, Deutschland)
- b) biotinylierter goat anti-mouse IgG Vectastain (Linaris, Weinheim, Deutschland)

Antikörperkomplexe:

- a) Peroxidase markierter Avidin-Biotin-Komplex Vectastain
(Peroxidase Standard ABC; FVIII, Maspin)
- b) Alkalische Phosphatase markierter Avidin-Biotin-Komplex Vectastain
(Alkalische Phosphatase Standard ABC Kit PK 5002; CD31)
- c) Dako CSA Rabbit Peroxidase Kit ready to use (Dako Cytomation; CD105)

4. Patienten und Methoden

4.1 Patienten

Aus den Instituten für Pathologie der Universitätskliniken Regensburg sowie Leipzig wurden Gewebeproben der Jahre 1992-2004 von insgesamt 62 Patienten untersucht. Das mittlere Alter der Patienten betrug 63,37 (49-75) Jahre, der *Gleason Score* erreichte Werte zwischen 5 und 10. Der PSA-Wert konnte zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 0,36 und 52,07ng/ml ermittelt werden. Die klinischen Daten der Patienten einschließlich der vorhandenen follow-up Daten sind in den Tabellen 1 bis 3 zusammengefasst.

Unmittelbar nach der Entnahme wurden alle Proben mit einer 4%-igen Formalinlösung fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu 100% Ethanol dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.

4.2 Vorbehandlung des Gewebes

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Paraffinblöcke zunächst mit einem Mikrotom in 4µm dicke Schichten geschnitten und anschließend im 42°C warmen Wasserbad auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Von jedem Block wurden zwischen 2 und 7 Schnitte angefertigt, die über 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet wurden. Nach der Entparaffinisierung erfolgte die Rehydrierung mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe.

Bei der Verwendung von Formalin als Fixationsmittel kommt es durch Quervernetzungen zwischen dem Aldehydanteil des Formalins und der spezifischen Antigenstruktur zu einer Maskierung der Antigene/Proteine im Gewebe (70, 71). Dadurch wird die immunhistochemische Färbung der Schnitte erschwert oder gar unmöglich gemacht. Um die Antigene für die Antikörper wieder zugänglich zu machen (Antigen-Demaskierung) wurde das Gewebe für die CD31-Färbung im Wasserbad (in TRIS-Puffer, pH 9,0) und für die FVIII-Färbung in der Mikrowelle (Zitrat-Puffer, pH 7,3) erhitzt. Lediglich für die CD105-Färbung war keine Vorbehandlung notwendig.

4.3 Immunhistochemische Färbung der Schnitte

Zur immunhistochemischen Färbung wurde die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) verwendet. Ihre Vorteile liegen in der hohen Sensitivität, der einfachen Handhabung und der geringen Hintergrundfärbung.

Eine zentrale Rolle spielt hierbei der Nachweis des Enzyms Peroxidase. Weil Peroxidase auch physiologisch in manchen Zellen des Körpers vorkommt, (v.a. weiße und rote Blutkörperchen) wurde diese endogene Peroxidase vor der immunhistochemischen Färbung durch Wasserstoff-Peroxid blockiert.

4.3.1. Prinzip der FVIII- und CD31-Färbung (ABC-Methode)

Der Primär-Ak bindet spezifisch an Antigen determinanten auf dem Gewebeschnitt. Im zweiten Schritt wird ein sekundärer, Biotin-markierter Antikörper (Brücken-Ak), hinzugegeben, der spezifisch an die Primär-Ak bindet. In dem danach applizierten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex agiert Avidin wie eine Brücke zwischen den biotinylierten Peroxidasemolekülen. Es bildet sich ein dreidimensionaler Gitterkomplex, der mehrere Peroxidasemoleküle enthält. Dieser Gitterkomplex ist in der Lage, an den Brücken-Ak zu binden und kann durch Zugabe des DAB-Substrates deutlich sichtbar gemacht werden. Das hierdurch entstehende Reaktionsprodukt stellt sich rot bis braun dar (72, 73).

4.3.2. Prinzip der CD105-Färbung (Dako CSA-Kit)

Das DAKO CSA System, das auf der modifizierten ABC-Methode (modifiziert, da Avidin durch Streptavidin ersetzt wurde) basiert und zusätzlich noch durch ein Signalamplifikationsreagenz verstärkt wird (modified ABC procedure utilizing catalysed signal amplification, CSA), ist extrem sensitiv.

Das Eiweißglykoprotein Streptavidin bindet sowohl das Vitamin Biotin (4 Moleküle) als auch das Enzym Peroxidase. Peroxidase wiederum bindet auch an Biotin. Es werden 5 Reagenzien benötigt.

Das erste Reagenz ist der Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist. Der Sekundärantikörper, der sich an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein mit Peroxidase konjugierter Streptavidin-Biotin-Komplex. Das vierte Reagenz ist das Signalamplifikationsreagenz, ein phenolisches Substrat (Biotinyl-Tyramid), das durch die gebundene Peroxidase katalysiert wird, ein unlösliches biotinyliertes Phenol bildet und sich um die Antigene herum ablagert. Das abgelagerte Biotin reagiert wiederum mit dem Streptavidin des fünften Reagenz, der Streptavidin-Peroxidase. Das führt zu einer zusätzlichen Bindung an Enzymmoleküle und damit zu einer zusätzlichen Umsetzung des DAB (Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid) in sein braunes Reaktionsprodukt.

Reagenzien des CSA-Kits:

1. Hydrogen Peroxide (Wasserstoffsuperoxid)
2. Protein Block
3. Link antibody: Biotinylierter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline (biotinylierter Sekundärantikörper)
4. Streptavidin-Biotin Complex, Reagenz A
Streptavidin-Biotin Complex, Reagenz B
Streptavidin-Biotin Complex, Diluent (Puffer)
Streptavidin-Biotin Complex mindestens 30min. vor Gebrauch herstellen:
1 ml Puffer + 40µl Reagenz A (1 Tropfen) + 40µl Reagenz B (1 Tropfen)
5. Amplification Reagent: Biotinylierte Tyramide und Wasserstoffperoxid
6. Streptavidin-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
7. Substrate Tablets, DAB Chromogen (DAB = 3,3`Diaminobenzidintetrahydrochlorid)
Substrate, Tris Buffer Concentrate (Tris-Pufferkonzentrat)
Substrate, Hydrogen Peroxide

Herstellung DAB, bzw. Chromogen-Substratlösung (CHROM):

- a) Substrattablette auf Raumtemperatur bringen
- b) 10 Tropfen des Tris-Pufferkonzentrats in einen Testtube bis 10ml mit A.d. auffüllen und mischen
- c) 1 Substrattablette zu dem angesetzten Gemisch dazugeben und auflösen → DAB-Lösung
- d) pro 2ml DAB-Lösung 1 Tropfen Wasserstoffperoxid → CHROM

(DAKO® Catalysed Signal Amplification (CSA) System, Peroxidase
DAKO Corporation • 6392 Via Real • Carpinteria, CA 93013 USA)

4.4. Durchführung der Färbungen

4.4.1 Durchführung ABC/Peroxidase-Methode (FVIII)

1. Schnitte über Nacht bei 37°C oder 30min bei 70°C trocknen
2. Entparaffinieren: Xylol (5min, 5min, 5-45min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5min 96% Ethanol, 5min 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
3. In der Mikrowelle bei 40% 30min in Citratpuffer pH 7,3 aufkochen (Antigen-Demaskierung), 30min Schnitte bei RT abkühlen lassen
4. Waschen in A.d.
5. 10min mit 3% H₂O₂, A.d. zur Blockierung der endogenen Peroxidase
6. Waschen in A.d. → PBS
7. 1h mit 10% goat/1% BSA/PBS blockieren der unspezifischen Bindungsstellen (RT)
8. ü.N. bei 4°C 1°AK Faktor VIII 1:600 in 7.) bei Raumtemperatur (rb anti-human von Willebrand Factor, Code No. A 0082, Dako)
9. Waschen mit PBS
10. 30min mit 2° AK anti-mouse/rabbit-biotinyliert 1:100 in 7.) (ABC-Kit) (RT) (StreptABComplex/HRP Duet mouse/rabbit, K0492, Dako)
11. Waschen in PBS

12. 30min in AB-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15min vor Gebrauch ansetzen
13. Waschen mit PBS
14. 5min mit DAB (RT) färben (1:50)
15. Waschen mit A.d. zum Abstoppen der Farbreaktion
16. 30Sek. mit Hämalaun gegenfärben
17. aufsteigende Alkohol Reihe → Xylol
18. Eindeckeln der Schnitte mit Entellane

4.4.2 Durchführung ABC/AP-Methode (CD31)

1. Schnitte ü.N. bei 37°C oder 30min bei 70°C trocknen
2. Entparaffinieren: Xylol (5min, 5min, 5-45min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5min 96% Ethanol, 5min 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
3. Im Autoklav (Wasserbad) bei 96°C 30min in TRS pH 9.0 erhitzen (Antigen Demaskierung) → 30min bei RT abkühlen (Target Retrieval Solution pH 9.0, Dako, REF S 2367)
4. Waschen in A.d. → TBS
5. 1h Blocken mit 10% Goat/1% BSA/TBS
6. 1° AK Pecam-1 (CD31 monoklonal) 1:20 in 5., ü.N. bei 4°C (mono mouse anti human CD31, clone: JC70A, DAKO)
7. Waschen in TBS
8. 1h mit 2° AK anti-mouse AP 1:50 in 5., (RT) (goat anti-mouse-AP konj., Sigma-Aldrich Chemie)
9. Waschen mit A.d.
10. Mit Fast Red unter mikroskopischer Kontrolle färben (RT) (Fast Red TR/Naphtol As Mx Ta, Sigma-Aldrich Chemie)
11. Waschen mit A.d. zum Abstoppen der Farbreaktion
12. 1min gegenfärben mit Hämalaun
13. Waschen mit A.d. (keine Alkohol Reihe)
14. Eindeckeln der Schnitte mit Aquatex® (Merck)

4.4.3 Durchführung DAKO CSA-Kit (CD105)

1. Schnitte ü.N. bei 37°C oder 30min bei 70°C trocknen
2. Entparaffinieren: Xylol (5min, 5min, 5-45min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5min 96% Ethanol, 5min 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
3. 5min H₂O₂
4. 5min A.d.
5. 5min Proteinblock
6. ü.N. 1° AK 1:500 in TBST bei 4°C
7. 5min TBST
8. 15min Link - AK
9. 5min TBST
10. 15min Streptavidin-Biotin-Komplex
11. 5min TBST
12. 15min Amplifikationsreagenz
13. 5min TBST
14. 15min Streptavidinperoxidase
15. 5min TBST
16. 5min DAB
17. A.d. spülen
18. 1min mit Hämalaun gegenfärben
19. A.d. spülen
20. Eindeckeln mit Aquatex

4.5 Mikroskopie und statistische Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden zuerst mit einem Mikroskop (Zeiss Axiophot, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe einer Übersichtsvergrößerung (5fach Objektiv) begutachtet, um entsprechend den Kriterien von Weidner (1995) Bereiche mit hoher Mikrogefäßdichte, sog. *hot spots*, ausfindig zu machen. Davon konnten mit Hilfe des digitalen Bildbearbeitungsprogramms Axiovision 4.7 (Carl Zeiss Vision,

Göttingen, Microimaging) pro Patient 4 bis 10 Bilder mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen werden.

Bei der Auswertung wurden alle Mikrogefäße berücksichtigt, die durch eine rote/bräunliche Anfärbung klar von anderen Mikrogefäßen, Tumorzellen oder Bindegewebe unterschieden werden konnten. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Schnitte hinsichtlich Gefäßanzahl (MVC), Gefäßfläche (VSA) und Gefäßabständen (IVAS). Die Anzahl der Mikrogefäße wurde hierbei manuell auf den Ausdrucken der jeweiligen Bilder ermittelt. Ebenso konnte mit Hilfe eines transparenten Gitternetzes, bestehend aus 2236 Quadraten (43x52) mit einer Kantenlänge von 4mm, die Gefäßfläche bestimmt werden. Das Gitternetz wurde dabei auf die Ausdrücke gelegt und jedes Quadrat, in dessen linker oberer Ecke ein Gefäß angeschnitten wurde, als positiv gewertet. Die Summe der positiven Ereignisse wurde anschließend im Verhältnis zur Gesamtzahl der Quadrate (2236) in Prozent angegeben. Schließlich konnten die mittleren Gefäßabstände mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Axiovision 4.7 (Carl Zeiss Vision, Göttingen, Microimaging) ermittelt werden (Tabellen 4 bis 6).

5. Ergebnisse

5.1. Allgemeine Deskription

5.1.1. Evaluierung klinischer Parameter des untersuchten Patientenkollektivs

Insgesamt wurden in dieser Studie 61 Patienten eingeschlossen mit einem Durchschnittsalter von 61 Jahren ($61 \pm 1,42$) und bezüglich der Gefäßversorgung und Maspinexpression untersucht. Die histopathologische Evaluierung der histologischen Präparate ergab nachfolgende Stadieneinteilung: Vom Patientenkollektiv wies 1 Patient (1,6%) ein Stadium T1, wiesen 22 Patienten (36,1%) ein Stadium T2 und 38 Patienten (62,3%) ein Stadium T3 auf. Der Nodalstatus konnte bei 60 Patienten (98,4%) ausgewertet werden, wobei in 10 Fällen (16,7%) positive Lymphknoten gefunden wurden (7x N1, 3x N2), bei den übrigen 50 Patienten (83,3%) konnten keine Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. Fernmetastasen konnten bei keinem der Patienten nachgewiesen werden, wobei lediglich die Ergebnisse von 48 der 61 Patienten (78,7%) hierzu vorlagen. Postoperativ konnte bei 31 Patienten (50,8%) kein Residualtumor mehr nachgewiesen werden, in 30 Fällen (49,2%) wurde ein mikroskopischer Residualtumor an den Schnittändern diagnostiziert. Bei 52 der 61 Patienten (85,2%) konnte eine exakte Angabe des *Gleason Score* aus den Befunden erhoben werden. Der niedrigste Score betrug 5, der höchste Score 10. Dabei wiesen 15 Patienten (28,9%) einen Score von 5, 10 Patienten (19,2%) einen Score von 6, 12 Patienten (23,1%) einen Score von 7, 8 Patienten (15,4%) einen Score von 8, 6 Patienten (11,5%) einen Score von 9 und 1 Patient (1,9%) einen Score von 10 auf. Der durchschnittliche PSA-Wert bei Erstdiagnose des Prostatakarzinoms aller Patienten betrug 13,4ng/ml. Bei 34 Patienten (55,7%) wurde eine Hormonentzugstherapie durchgeführt, in 21 Fällen (61,8%) erfolgte diese perioperativ, in 13 Fällen (38,2%) postoperativ. Der Zeitraum der Hormonbehandlungen variierte zwischen 1 und 168 Monaten. Die übrigen 27 (44,3%) Patienten wurden nicht adjuvant bzw. neoadjuvant vorbehandelt. In 20 Fällen (34,4%) konnte durch postoperative Messungen des Serum PSA-Wertes ein erneutes Auftreten des Prostatakarzinoms innerhalb von 3 Jahren festgestellt werden. In 38 Fällen (65,6%) trat der Tumor in dieser Zeit nicht noch einmal auf. Bei 3 Patienten konnte postoperativ kein Verlauf ermittelt werden. Der postoperative Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 6 bis 140 Monaten und

betrug durchschnittlich 62,3 Monate. Bis zum Ende dieses Zeitraums (14.7.2009) waren 15 der 61 Patienten (24,6%) verstorben (Tabellen 1, 2, 3, 7).

5.1.2. Beziehung zwischen rezidivfreiem und Gesamtüberleben und den klinischen Parametern bei dem untersuchten Patientenkollektiv

Zu Beginn der Auswertung soll untersucht werden, ob die klinischen Parameter (Alter, T-, N-, R-Status, *Gleason Score*, PSA-Wert, Vorhandensein von Rezidiven, Anwendung von Hormonanaloga, Bluthochdruck) einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben haben.

In unserer Studie hatte das Alter sowohl auf das Gesamtüberleben ($p=0,857$) als auch auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,432$) keinen signifikanten Einfluss.

Das T-Stadium erwies sich als statistisch hoch signifikanter Parameter in Bezug auf die Prognose für die Überlebenszeit ($p=0,006$). Hinsichtlich der Prognose für die rezidivfreie Zeit ($p=0,099$) konnte lediglich eine Tendenz ausgemacht werden, die statistisch nicht signifikant war. Das Kaplan-Meier Verfahren ergab 10 Jahres-Überlebensraten für das Stadium T2 von 93%, Patienten im Stadium T3 überlebten 10 Jahre zu 48%. Da nur ein Patient das Stadium T1 aufwies konnte hier keine statistische Auswertung erfolgen.

Der Nodalstatus stellte sich als ein nicht statistisch signifikanter prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben ($p=0,142$) wie auch für die rezidivfreie Zeit ($p=0,311$) der Patienten nach Operation heraus. Allerdings besitzt diese Statistik aufgrund der geringen Anzahl an Patienten mit Status N1 (7x) bzw. N2 (3x) nur geringe Aussagekraft.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte zwischen dem Vorhandensein von mikroskopischen Residualtumoren und der Gesamtüberlebensrate ausgemacht werden ($p=0,025$). Bezüglich des rezidivfreien Überlebens konnte hingegen bezüglich des Residualtumors keine Signifikanz festgestellt werden ($p=0,591$).

Bei der Betrachtung des *Gleason Score* wurde keine Signifikanz bezüglich des Gesamtüberlebens erkannt ($p=0,539$), während bezüglich der rezidivfreien Zeit sehr wohl eine signifikante Korrelation festgestellt wurde ($p=0,038$).

Der präoperative PSA-Wert stand in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang zum Gesamt- ($p=0,660$) bzw. rezidivfreien ($p=0,154$) Überleben. Wie zu erwarten erwies sich das Vorhandensein bzw. das Fehlen eines Rezidivtumors als höchst signifikant ($p=0,001$) bezüglich der Prognose des Gesamtüberlebens der Patienten.

Patienten, die durch eine Hormonentzugstherapie adjuvant behandelt wurden, konnten tendenziell eine höhere Gesamtüberlebenszeit ($p=0,578$) und vor allem auch eine höhere rezidivfreie Zeit ($p=0,183$) aufweisen, eine statistisch signifikante Korrelation wurde jedoch nicht nachgewiesen.

Ebenfalls wurde der Ko-Morbiditätsfaktor Hypertonie untersucht. Der Bluthochdruck hatte in unserer Studie sowohl auf das Gesamtüberleben ($p=0,202$) als auch auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,363$) keinen signifikanten Einfluss (Tabelle: 8).

5.2. Morphometrische Auswertung der Tumervaskularisation

5.2.1. Mikrogefäßdichte der Prostatakarzinome (MVC)

Für den Marker FVIII konnte an insgesamt 59 Patienten die Anzahl der Blutgefäße ermittelt werden, 2 Patienten wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Im Tumorgewebe wurden jeweils bis zu 6 *hot spots* ausgezählt, im Normalgewebe 2. Dabei variierte die Zahl der Blutgefäße im Tumorgewebe zwischen 5 und 51 und im Normalgewebe zwischen 3 und 26. Insgesamt ergab sich ein Mittelwert (MW) von 16,5 und ein Median von 15,3. In 32 Fällen (54,2%) wurde ein $MVC < MW$, in 27 Fällen (45,8%) ein $MVC \geq MW$ bestimmt.

Eine etwas höhere durchschnittliche Anzahl an Blutgefäßen wurde für den Marker CD31 gefunden. Bei 54 von 61 auswertbaren Fällen (88,5%) betrug der Mittelwert 20,2, der Median 17,8. Unterhalb des Mittelwerts wurden 33 Fälle (61,1%), oberhalb letztendlich nur 21 Fälle (38,9%) gezählt. Die Analyse erfolgte wieder anhand von 6 *hot spots* im Tumor-, sowie 2 *hot spots* im Normalgewebe. Die Gefäßanzahl betrug dabei im Tumorgewebe mindestens 5 und höchstens 61, im Normalgewebe mindestens 3 und höchstens 31.

Für die Gefäßzählung des Antikörpers CD105 konnten insgesamt 45 der 61 Fälle (73,8%) akquiriert werden, in 16 Fällen (26,2%) lagen keine auswertbaren Präparate vor. Die Zahl der untersuchten *hot spots* wurde genauso gewählt wie bei den beiden anderen Markern zuvor (Tumorgewebe 6, Normalgewebe 2). Der Mittelwert wurde mit 17,1 berechnet, der Median mit 17,0. Ausgehend vom Mittelwert wiesen 24 Fälle (53,3%) einen niedrigeren und 21 Fälle (46,7%) einen höheren Wert auf. Im Tumorgewebe waren zwischen 5 und 44 und im Normalgewebe zwischen 3 und 23 Blutgefäße markiert worden. Die durchschnittliche Anzahl an Blutgefäßen von Marker CD105 lag damit zwischen den beiden zuvor beschriebenen Markern FVIII und CD31 ($MVC\ FVIII < MVC\ CD105 < MVC\ CD31$).

5.2.2. Vaskuläre Gefäßfläche der Prostatakarzinome (VSA)

In der nächsten Auswertung wurden die jeweiligen Gefäßflächen der drei Marker genauer untersucht. Die Analyse erfolgte hierbei, wie schon bei der Analyse der Gefäßanzahl, durch Auszählen von insgesamt 6 *hot spots* im Tumor-, sowie 2 *hot spots* im Normalgewebe.

Beim Antikörper FVIII wurden letztendlich 59 der 61 Fälle (96,7%) ausgewertet. Die Gefäßfläche betrug im untersuchten Bereich im Tumorgewebe zwischen 1,0 und 19,1 Prozent, im Normalgewebe zwischen 1,7 und 35,4 Prozent. Der Mittelwert konnte mit 4,8, der Median mit 4,6 angegeben werden. Unterhalb des Mittelwertes lagen 32 Präparate (54,2%), oberhalb 27 (45,8%).

Exakt derselbe Mittelwert wurde beim Marker CD31 errechnet (4,8). Die genaue Verteilung der Fälle erfolgte nach folgendem Muster: 28 Fälle $< MW$ (51,9%), 26 Fälle $\geq MW$ (48,1%). Der Median lag mit einem Wert von 4,7 etwas niedriger. Letztendlich gingen 54 der 61 Fälle (88,5%) in die Auswertungen mit ein, 7 Präparate (11,5%) wurden von den Untersuchungen aufgrund schlechter Färbung ausgeschlossen. Die Gefäßfläche erreichte im Tumorgewebe einen Anteil von 1,1 bis 18,9 Prozent, im Normalgewebe einen Anteil von 2,0 bis 29,9 Prozent.

Für den Antikörper CD105 gingen, ebenso wie bei der Analyse der Gefäßanzahl, insgesamt 45 Fälle (73,8%) in die Auswertungen mit ein, 16 Fälle (26,2%) wurden

wegen zu geringer Tumorgöße oder schlechter Färbungen ausgeschlossen. Der Mittelwert wurde mit 2,8 berechnet und stellte sich damit als niedriger als seine beiden Vorgänger heraus ($VSA_{CD105} < VSA_{FVIII} = VSA_{CD31}$). Von der Gesamtzahl waren 27 Fälle (60,0%) unter sowie 18 Fälle (40,0%) über dem Mittelwert angesiedelt. Der Median betrug 2,5. Die minimale Gefäßfläche im Tumorbereich betrug 0,5%, die maximale 10,8%. Im Normalgewebe wurde die Gefäßfläche mit einem Anteil von mindestens 0,9 und höchstens 29,9 Prozent bestimmt.

5.2.3. Abstände der Mikrogefäße der Prostatakarzinome (IVAS)

Abschließend wurden die jeweiligen Gefäßabstände der drei Marker untersucht. Nach dem gleichen Muster wie zuvor wurden jeweils 6 *hot spots* im Tumor-, sowie 2 *hot spots* im Normalgewebe analysiert.

Wie bereits in den vorherigen Untersuchungen zu Gefäßanzahl und -fläche wurden für den Marker FVIII auch in diesem Fall 59 der 61 Präparate (96,7%) in die Auswertungen miteinbezogen. Der Mittelwert konnte mit 81,7µm berechnet werden, 29 Fälle (49,2%) lagen unter und 30 Fälle (50,8%) über diesem Wert. Der entsprechende Median betrug 81,8µm. Die Gefäßabstände im Tumorgewebe variierten zwischen 49,9µm und 171,4µm, im Normalgewebe zwischen 37,4µm und 135,8µm.

Ein wesentlich niedrigerer Mittelwert wurde beim Marker CD31 errechnet, dieser betrug 72,4µm. Von den 54 untersuchten Präparaten (88,5%) verteilten sich insgesamt 31 (57,4%) unterhalb und 23 (42,6%) oberhalb dieses Wertes. Der Median konnte mit einem Wert von 71,1µm bestimmt werden. Die Gefäßabstände im Tumorgewebe erreichten Werte von 34,2µm bis 149,0µm. Im Normalgewebe wurden Abstände von 42,9µm bis 129,8µm gemessen.

Für den Antikörper CD105 wurden in 43 der 61 Fälle (70,5%) Untersuchungen bezüglich der Gefäßabstände unternommen, 18 Fälle (29,5%) konnten nicht ausgewertet werden und wurden somit ausgeschlossen. Insgesamt 22 Fälle (51,2%) wiesen einen Wert unter, bzw. 21 Fälle (48,8%) einen Wert über dem Mittelwert auf, der mit 86,0µm angegeben werden konnte. Die Berechnung des

Medians erbrachte einen etwas geringeren Wert von 85,2µm. Im Tumorgewebe wurden Gefäßabstände von mindestens 40,0µm und höchstens 157,2µm gemessen, im Normalgewebe lagen die Abstände zwischen 47,7µm und 127,4µm. Der Vergleich der Gefäßabstände der drei Marker FVIII, CD31 und CD105 brachte also folgendes Ergebnis: IVAS CD31<IVAS FVIII<IVAS CD105.

5.2.4. Beziehung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens mit den Gefäßparametern MVC, VSA, IVAS

Des Weiteren wurde untersucht ob die Parameter MVC, VSA und IVAS des Markers FVIII einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- bzw. das rezidivfreie Überleben haben. Zu Beginn erfolgte die Analyse der Gefäßanzahl: Insgesamt 55 Fälle (31<MW, 24≥MW; MW=16,5) gingen hierbei in die Auswertungen bezüglich des Gesamtüberlebens mit ein, es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen werden ($p=0,358$; log rank-Test). Für die Gruppe mit niedriger Gefäßanzahl wurde ein mittleres Gesamtüberleben von $104\pm9,6$ Monaten errechnet, für die Gruppe mit hoher Gefäßanzahl betrug die Zeitspanne $111\pm9,2$ Monate. Der Einfluss auf das rezidivfreie Überleben wurde an 56 Präparaten (32<MW, 24≥MW) untersucht, eine Signifikanz wurde nicht nachgewiesen ($p=0,417$; log rank-Test). Patienten mit niedrigem MVC wiesen hierbei ein mittleres rezidivfreies Überleben von $86\pm8,8$ Monaten auf, Patienten mit hohem MVC entsprechend $76\pm11,1$ Monate. Bei der prognostischen Beurteilung des Einflusses der Gefäßfläche auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben gingen insgesamt 55 Fälle (32<MW, 23≥MW; MW=4,8) für das Gesamt- sowie 56 Fälle (32<MW, 24≥MW) für das rezidivfreie Überleben in die statistische Analyse mit ein. In unserer Studie hatte die Gefäßfläche sowohl auf das Gesamtüberleben, ($p=0,526$; log rank-Test) als auch auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,985$; log rank-Test) keinen signifikanten Einfluss. Für das mittlere Gesamtüberleben ergaben sich folgende Ergebnisse: VSA<MW: $95\pm7,9$ Monate; VSA≥MW: $113\pm9,9$ Monate. Die Resultate bezüglich des mittleren rezidivfreien Überlebens lauteten: VSA<MW: $82\pm9,6$ Monate; VSA≥MW: $81\pm10,0$ Monate. Ebenso stellten sich die Gefäßabstände als ein nicht statistisch signifikanter prognostischer Parameter für

das Gesamtüberleben ($p=0,570$; log rank-Test) der Patienten nach Operation heraus. Hierfür wurden 55 Fälle ($26 \leq MW$, $29 > MW$; $MW=81,7$) ausgewertet. Die mittlere Gesamtüberlebenszeit konnte für Patienten mit niedrigen Gefäßabständen mit $108 \pm 9,2$ Monaten und für Patienten mit hohen Gefäßabständen mit $106 \pm 10,0$ Monaten angegeben werden. In die Auswertungen hinsichtlich der rezidivfreien Zeit gingen 56 Fälle ($27 \leq MW$, $29 > MW$) mit ein: Bei Patienten mit $IVAS \leq MW$ betrug die Zeitspanne durchschnittlich $82 \pm 10,0$ Monate, bei Patienten mit $IVAS > MW$ nur $81 \pm 9,6$ Monate. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,898$; log rank-Test).

In einer weiteren Untersuchung wurde analysiert ob die Parameter MVC, VSA und IVAS des Markers CD31 einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben haben. Bei der Auswertung der Gefäßanzahl wurden 50 Fälle ($31 < MW$, $19 \geq MW$; $MW=20,2$) hinsichtlich des Gesamtüberlebens untersucht. Als mittlere Überlebenszeit wurde für die Patienten mit niedriger Gefäßanzahl eine Dauer von $112 \pm 9,3$ Monaten und für Patienten mit hoher Gefäßanzahl ein Zeitraum von $104 \pm 8,9$ Monaten errechnet. Ein signifikanter Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit konnte jedoch nicht festgestellt werden ($p=0,940$; log rank-Test). Die Analyse bezüglich des rezidivfreien Überlebens wurde an 51 Präparaten ($32 < MW$, $19 \geq MW$) durchgeführt. Für das durchschnittliche rezidivfreie Überleben ergab sich für Patienten mit $MVC < MW$ ein Wert von $100 \pm 10,4$ Monate, für Patienten mit $MVC \geq MW$ ein Wert von $80 \pm 12,4$ Monate. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,600$; log rank-Test). Ebenso hatte die Gefäßfläche keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,657$; log rank-Test) als auch auf das rezidivfreie Überleben ($p=0,977$; log rank-Test). Wie schon bei der Analyse der Gefäßanzahl wurden auch bei dieser Untersuchung 50 Fälle ($27 < MW$, $23 \geq MW$; $MW=4,8$) hinsichtlich des Gesamtüberlebens verglichen. Es ergaben sich folgende mittlere Überlebenszeiten: $VSA < MW$: $110 \pm 9,3$ Monate; $VSA \geq MW$: $114 \pm 13,0$ Monate. Hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens erfolgte die Auswertung anhand von 51 Fällen ($27 < MW$, $24 \geq MW$). Die durchschnittlichen rezidivfreien Zeiten der beiden Gruppen waren: $VSA < MW$: $85 \pm 9,9$ Monate; $VSA \geq MW$: $97 \pm 12,5$ Monate. Letztendlich erfolgte die statistische Auswertung der Gefäßabstände: Nach der Untersuchung von insgesamt 50 Fällen ($29 \leq MW$, $21 > MW$; $MW=72,4$) musste festgestellt werden, dass bezüglich der Gesamtüberlebenszeit keine Signifikanz nachweisbar war ($p=0,692$; log rank-Test).

Patienten mit niedrigen Gefäßabständen überlebten durchschnittlich $103 \pm 7,3$ Monate, Patienten mit hohen Gefäßabständen entsprechend $110 \pm 12,4$ Monate. Auch hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens war kein signifikanter prognostischer Einfluss festzustellen ($p=0,337$; log rank-Test). Hierbei waren 51 Fälle ($29 \leq MW$, $22 > MW$) untersucht worden. Bei Patienten mit $IVAS \leq MW$ betrug die rezidivfreie Zeit durchschnittlich $91 \pm 9,1$ Monate, bei Patienten mit $IVAS > MW$ lediglich $88 \pm 13,5$ Monate.

Schließlich wurde geprüft, ob die Parameter MVC, VSA und IVAS des Markers CD105 einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- bzw. rezidivfreie Überleben haben. Der prognostische Einfluss der Gefäßanzahl auf das Gesamtüberleben wurde an 41 Präparaten ($21 < MW$, $20 \geq MW$; $MW=17,1$) untersucht. Patienten mit niedrigem MVC überlebten durchschnittlich $111 \pm 10,5$ Monate, Patienten mit hohem MVC nur $110 \pm 12,9$ Monate. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,883$; log rank-Test). Der Zusammenhang zwischen Gefäßanzahl und rezidivfreiem Überleben wurde an 42 Präparaten ($21 < MW$, $21 \geq MW$) analysiert, ein signifikanter Einfluss wurde hierbei nicht festgestellt ($p=0,293$; log rank-Test). Das mittlere rezidivfreie Überleben für $MVC < MW$ betrug $88 \pm 10,0$ Monate, für $MVC \geq MW$ immerhin $122 \pm 9,7$ Monate. Der Einfluss der Gefäßfläche auf die Gesamt- bzw. rezidivfreie Überlebenszeit wurde an 41 ($26 < MW$, $15 \geq MW$; $MW=2,8$) bzw. 42 Patienten ($27 < MW$, $15 \geq MW$) untersucht. Bezüglich des mittleren Gesamtüberlebens ergaben sich folgende Ergebnisse: $VSA < MW$: $104 \pm 11,5$ Monate; $VSA \geq MW$: $110 \pm 7,1$ Monate. Die entsprechenden Resultate für die durchschnittlichen rezidivfreien Überlebenszeiten lauteten folgendermaßen: $VSA < MW$: $108 \pm 10,6$ Monate; $VSA \geq MW$: $107 \pm 9,4$ Monate. Weder hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit ($p=0,214$; log rank-Test) noch bezüglich der rezidivfreien Überlebenszeit ($p=0,339$; log rank-Test) konnte eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Zum Abschluss erfolgte die Analyse der Gefäßabstände: An 39 Präparaten ($21 < MW$, $18 \geq MW$; $MW=86,0$) wurde der Zusammenhang zwischen den Gefäßabständen und der Gesamtüberlebenszeit untersucht. Die Auswertung ergab einen p-Wert von 0,632 (log rank-Test), eine Signifikanz konnte also nicht festgestellt werden. Patienten mit niedrigen Gefäßabständen überlebten hierbei durchschnittlich $95 \pm 9,4$ Monate, Patienten mit hohen Gefäßabständen immerhin $116 \pm 11,9$ Monate. Der Einfluss der Gefäßabstände auf das rezidivfreie Überleben wies ebenfalls keine statistische Signifikanz auf ($p=0,994$; log rank-

Test). Hierbei gingen 40 Fälle ($21 \leq \text{MW}$, $19 > \text{MW}$) in die Messungen mit ein, die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit für Patienten mit $\text{IVAS} \leq \text{MW}$ betrug $97 \pm 9,9$ Monate, für Patienten mit $\text{IVAS} > \text{MW}$ wurde ein Zeitraum von $116 \pm 10,9$ Monaten errechnet (Tabelle 9).

5.3. Korrelation der Gefäßparameter MVC, VSA und IVAS für die Marker FVIII, CD31, CD105

In den folgenden Auswertungen wurden nacheinander Gefäßanzahl, Gefäßfläche sowie Gefäßabstände der einzelnen Marker verglichen. Die gesammelten Werte wurden dabei jeweils auf signifikante Korrelationen nach *Pearson* untersucht.

Der statistische Vergleich der Mittelwerte für MVC der beiden Marker FVIII und CD31 ergab einen Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* (CC) von 0,443, die Werte verhalten sich damit höchst signifikant zueinander ($p=0,001$). Bei der Korrelation der Anzahl der Blutgefäße zwischen den Markern FVIII und CD105 ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,171 und ein p-Wert von 0,266. Eine Signifikanz konnte also nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich der Vergleich der Marker CD31 und CD105 als statistisch nicht signifikant ($p=0,086$), es konnte lediglich eine Tendenz diesbezüglich festgestellt werden. Der entsprechende Korrelationskoeffizient betrug 0,275.

In der nächsten Auswertung wurden die jeweiligen Gefäßflächen der drei Marker miteinander verglichen. Die Analyse der beiden Marker FVIII und CD31 erbrachte einen Korrelationskoeffizienten von 0,226, eine Signifikanz konnte damit nicht nachgewiesen werden ($p=0,104$). Bei der Untersuchung der beiden Marker FVIII und CD105 wurde ein Korrelationskoeffizient von 0,282 und ein p-Wert von 0,063 errechnet. Somit konnte in diesem Vergleich keine Signifikanz, sondern lediglich eine Tendenz aufgezeigt werden. Auch die zwei Marker CD31 und CD105 verhielten sich nicht signifikant zueinander ($p=0,200$). Sie wiesen einen Korrelationskoeffizienten von 0,207 auf.

Abschließend wurden die jeweiligen Gefäßabstände der drei Marker untersucht und miteinander verglichen. Die Korrelation der Marker FVIII und CD31 ergab einen Koeffizienten von 0,216, eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen

werden ($p=0,121$). Der Vergleich der beiden Marker FVIII und CD105 erwies sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,060 als nicht signifikant ($p=0,706$). Die abschließende Korrelation der beiden Marker CD31 und CD105 stellte sich dagegen als sehr signifikant heraus ($p=0,004$). Der Korrelationskoeffizient wurde mit 0,453 angegeben (Tabelle 10).

5.4 Evaluierung der Maspinexpression bei Patienten mit Prostatakarzinomen

5.4.1 Ermittlung des rezidivfreien Überlebens und Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der Maspinexpression

In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss der Maspinexpression auf die Gesamt- bzw. rezidivfreie Überlebenszeit analysiert. Maspin wird in normalen Prostataepithelzellen exprimiert, in den entsprechenden Karzinomzellen hingegen herunterreguliert. Eine verringerte Maspinexpression sollte also mit einer Tumorprogression korrelieren und könnte somit als Prognosefaktor dienen. Diese These sollte an insgesamt 38 Präparaten bezüglich der Gesamtüberlebenszeit untersucht werden, wobei 24 Fälle (63,2%) eine verminderte und 14 Fälle (36,8%) eine erhöhte Maspinexpression aufwiesen. Ein signifikanter Zusammenhang konnte hierbei jedoch nicht festgestellt werden ($p=0,772$; log rank-Test). Auch hinsichtlich der rezidivfreien Überlebenszeit wurde keine Signifikanz nachgewiesen ($p=0,854$). Von den insgesamt 39 Fällen waren 25 (64,1%) mit einer verminderten und 14 (35,9%) mit einer erhöhten Maspinexpression in die Auswertungen mit eingegangen (Tabelle 9).

5.4.2 Korrelation der Maspinexpression mit der Vaskularisation anhand der ermittelten Gefäßparameter

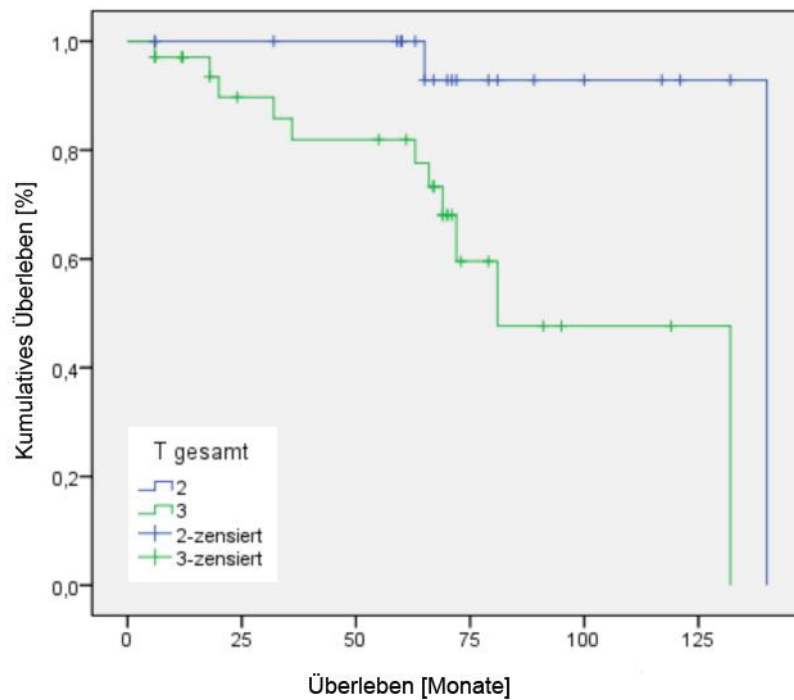
Abschließend sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Maspinexpression und der Vaskularisation geprüft werden. Hierbei wurden die Gefäßparameter MVC,

VSA und IVAS im Vergleich zur Maspinexpression auf signifikante Korrelationen nach *Pearson* untersucht.

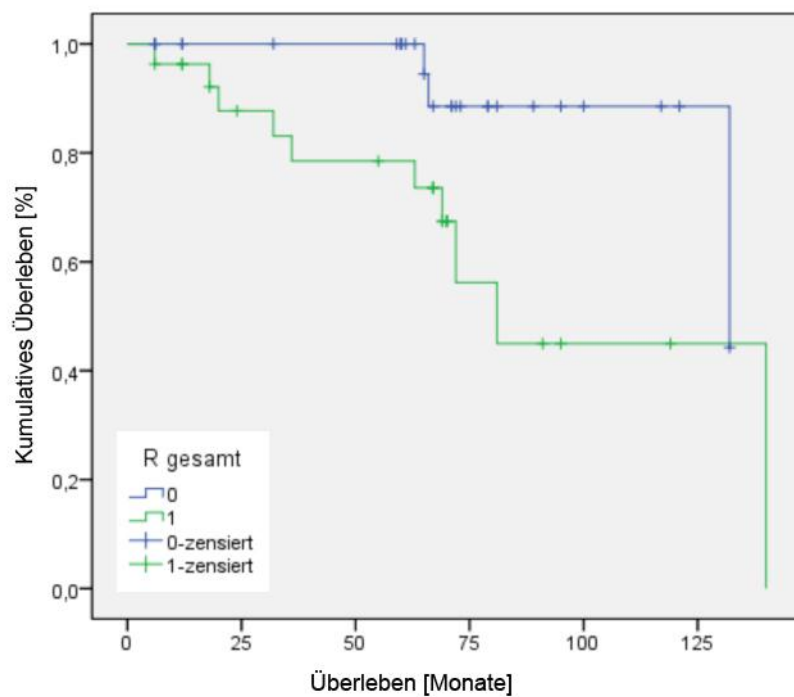
Zunächst erfolgte die Analyse der Gefäßanzahl: Der statistische Vergleich der Maspinexpression mit der Anzahl der Blutgefäße des Markers FVIII ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,080. Eine Signifikanz konnte also nicht nachgewiesen werden ($p=0,618$). Ebenso erwies sich die Korrelation zwischen Maspinexpression und CD31 als nicht signifikant ($p=0,986$). Der dazugehörige Korrelationskoeffizient lautete -0,003. Bezüglich des Antikörpers CD105 wurde ein p-Wert von 0,357 errechnet, eine Signifikanz wurde somit nicht erkannt. Der entsprechende Korrelationskoeffizient konnte mit -0,158 angegeben werden.

Anschließend wurden die jeweiligen Gefäßflächen mit der Maspinexpression verglichen: Für den Antikörper FVIII ergab sich bei diesem Vergleich ein CC-Wert von -0,198. Eine Signifikanz konnte nicht bestätigt werden ($p=0,214$). Auch der Marker CD31 stellte sich mit einem p-Wert von 0,062 als nicht signifikant heraus, es konnte jedoch zumindest eine Tendenz abgeleitet werden. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,302. Aus dem Vergleich zwischen Maspinexpression und Marker CD105 resultierte ein p-Wert von 0,348. Damit konnte auch in diesem Fall bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,161 keine Signifikanz nachgewiesen werden.

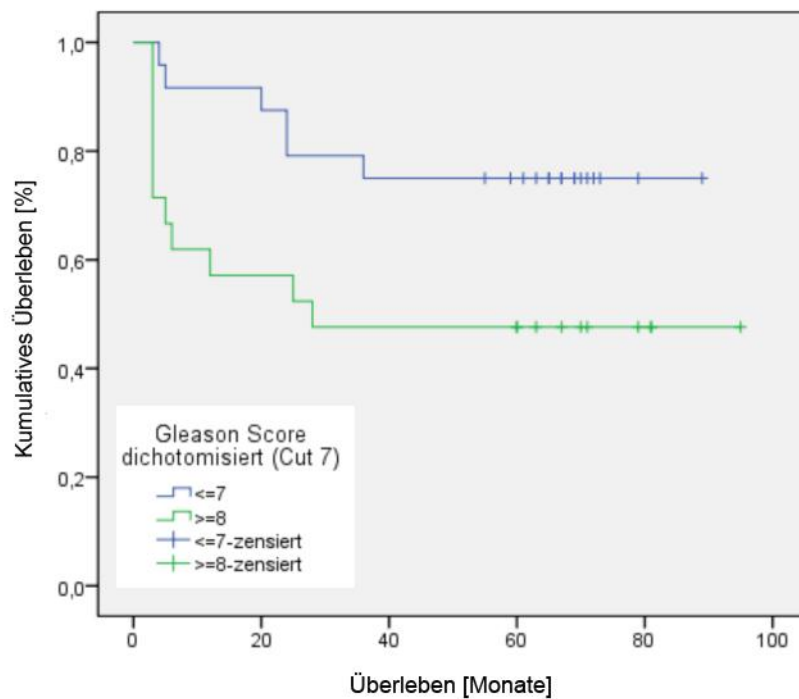
Letztendlich wurden noch die Gefäßabstände genauer untersucht: Für den Antikörper FVIII ergab sich im Vergleich zur Maspinexpression ein Korrelationskoeffizient von -0,069 und damit keine Signifikanz ($p=0,667$). In einer weiteren Analyse wurde für CD31 ein p-Wert von 0,020 errechnet und damit auch eine Signifikanz nachgewiesen. Der entsprechende Korrelationskoeffizient betrug 0,372. Bei der Korrelation des Markers CD105 mit der Maspinexpression ergab sich ein CC-Wert von 0,123. Eine Signifikanz konnte also nicht bestätigt ($p=0,488$) werden (Tabelle 11).

Signifikante Graphen:

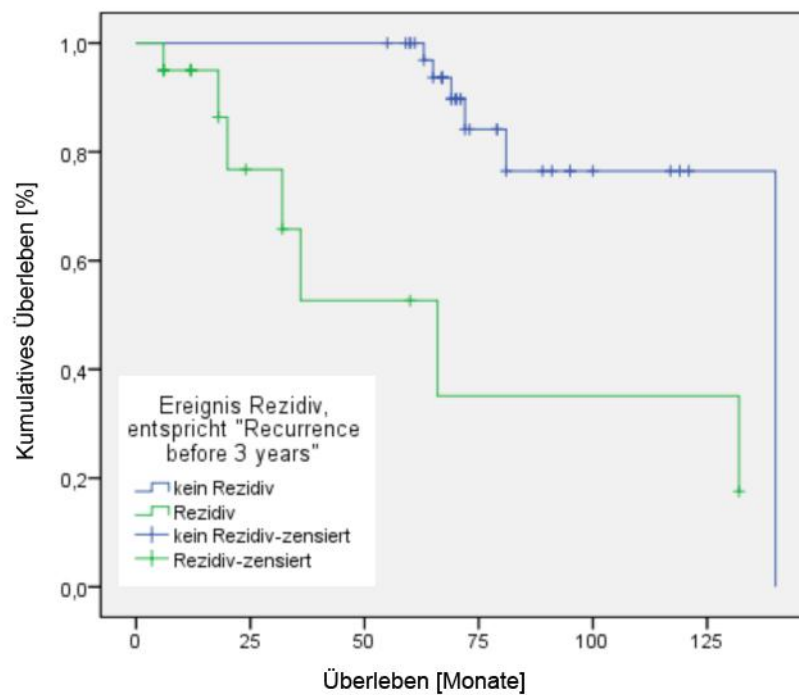
(Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom T2- bzw. T3-Stadium)



(Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Auftreten Residualtumor)

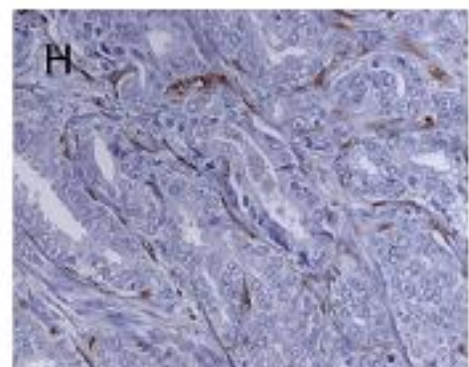
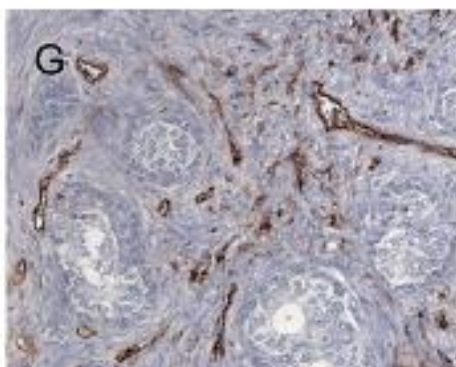
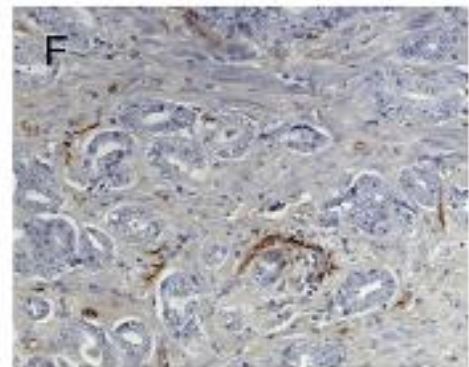
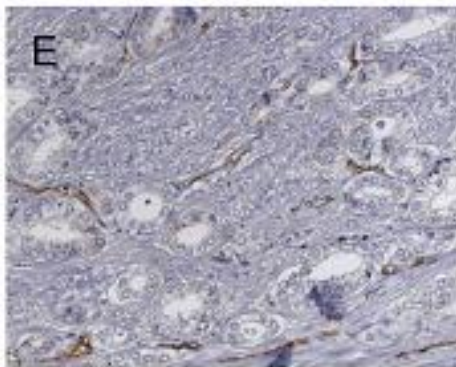
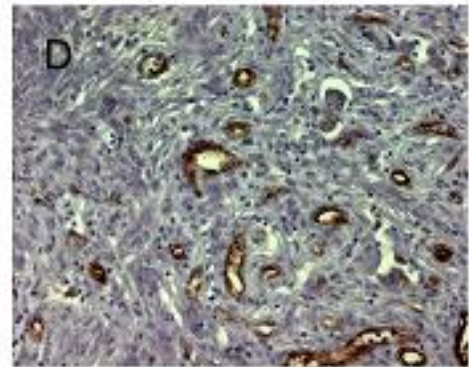
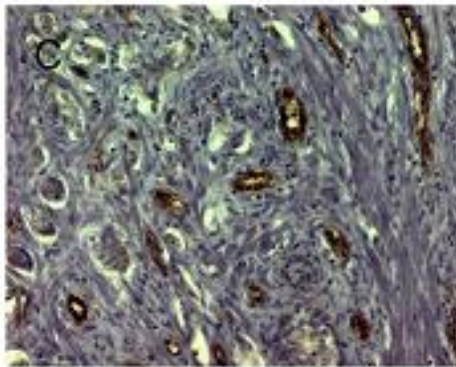
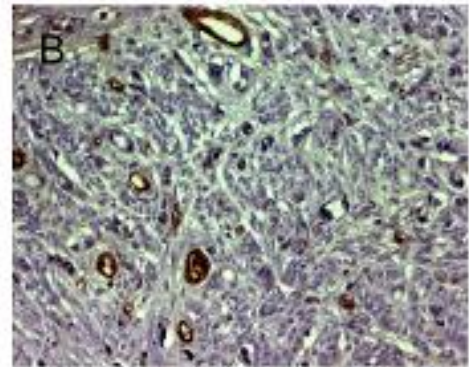
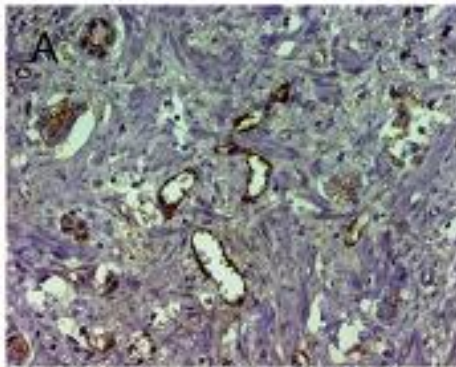


(Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Gleason Score)

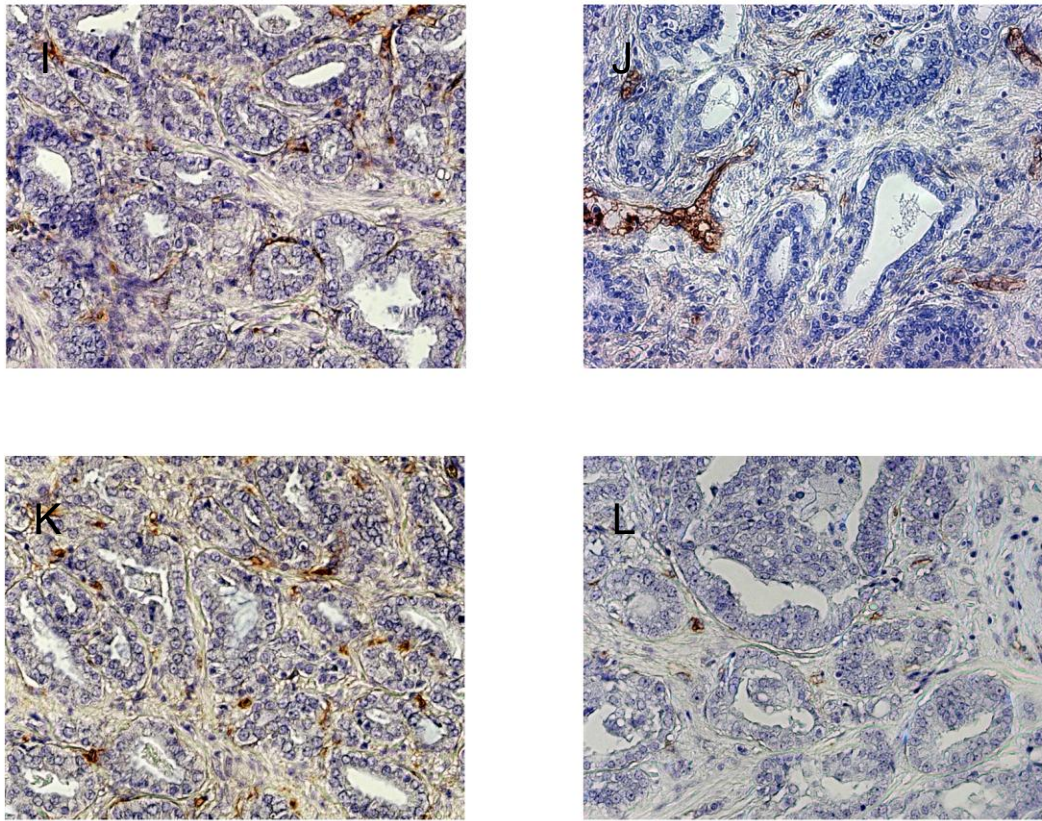


(Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Auftreten von Rezidiven innerhalb 3 Jahre)

Histologische Bilder:



(Histologische Bilder eines Prostatakarzinoms mit Färbung gegen FVIII und CD31)



(Histologische Bilder eines Prostatakarzinoms mit Färbung gegen CD105)

Legende zu den Abbildungen

A - D) Immunhistochemische Anfärbung von Gefäßendothelien mit einem Antikörper gegen FVIII. Aktivierte Endothelzellen färben sich braun.

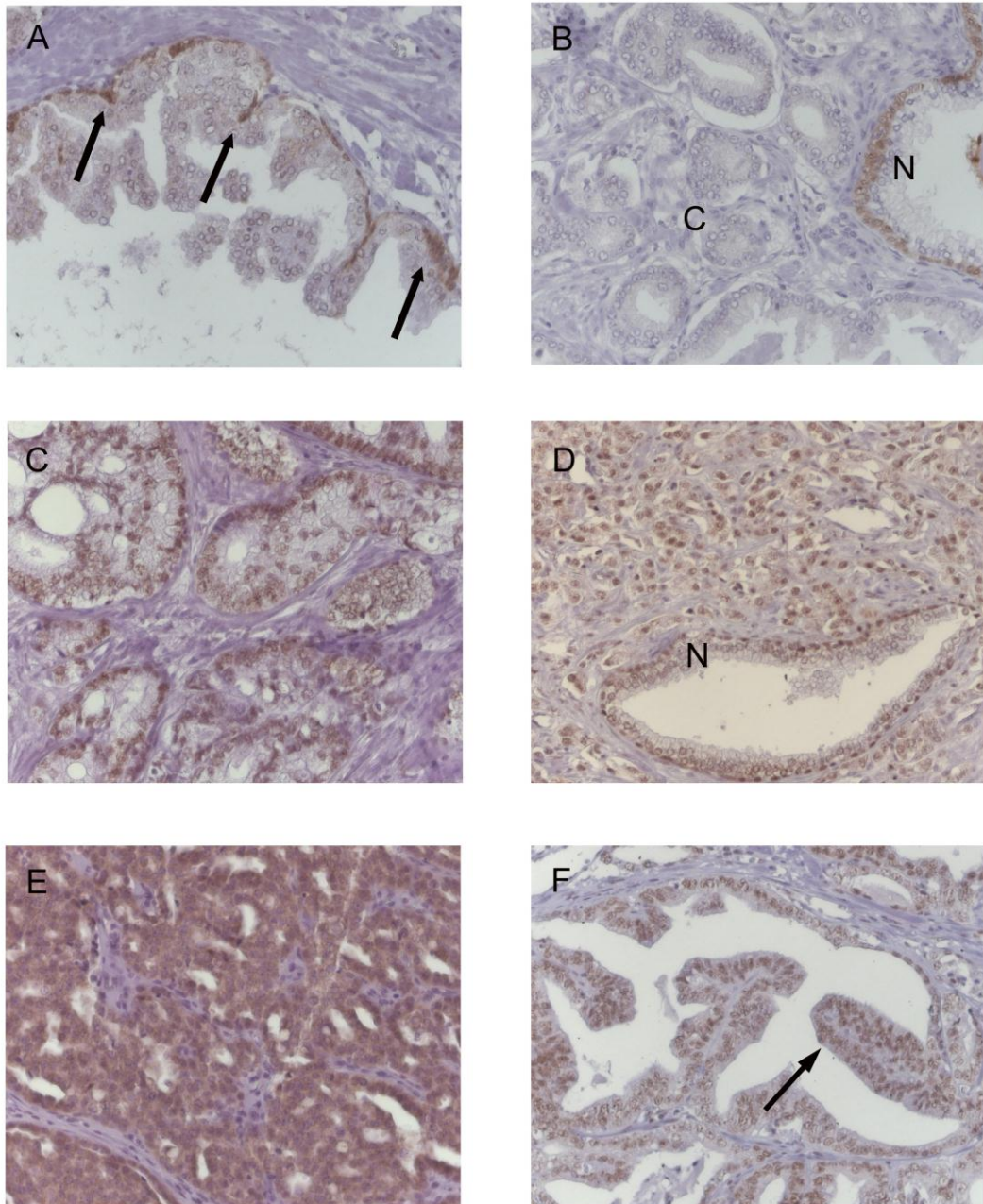
Vergrößerung 20-fach

E - H) Immunhistochemische Anfärbung der Gefäßendothelien mit einem Antikörper gegen CD31. Auch hier sind die Endothelzellen braun angefärbt.

Vergrößerung 20-fach

I - L) Immunhistochemische Anfärbung der Gefäßendothelien mit einem Antikörper gegen CD105. Die Endothelzellen sind ebenso braun angefärbt.

Vergrößerung 20-fach



(Histologische Bilder eines Prostatakarzinoms mit Maspinfärbung)

Legende zu den Abbildungen

- A)** Die immunhistochemische Anfärbung von Maspin zeigt eine kräftige nukleäre wie auch zytoplasmatische Positivität in der basalen Zellschicht der Drüsenepithelien. Hingegen ist Maspin in den apikalen Drüsenepithelien nicht nachweisbar.

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

- B)** Der überwiegende Anteil der Prostatakarzinome (C) zeigt eine komplette Negativität für Maspin, bei gleichzeitiger Positivität in der Basalzellschicht nicht befallener Drüsen (N).

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

- C)** Ein repräsentatives Prostatakarzinom mit einem Gleason 3B/C Pattern und einer exklusiven nukleären Maspinexpression.

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

- D)** Ein repräsentatives Prostatakarzinom mit einem Gleason 4B Pattern und einer exklusiven nukleären Maspinexpression. Zusätzlich ist zentral eine reguläre Drüse (N) mit einer basalen Maspinexpression nachweisbar.

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

- E)** Ein repräsentatives Prostatakarzinom mit einem Gleason 4B Pattern und einer nukleären wie zytoplasmatischen Maspinexpression.

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

- F)** Auch intraduktale Vorläuferläsionen (PIN III) zeigen teilweise eine nukleäre Maspinexpression in den apikalen Drüsenepithelien.

Vergrößerung 20-fach (DAB Färbung)

6. Diskussion

Als etablierte Prognosefaktoren für Prostatakarzinome gelten derzeit das klinische und pathologische Tumorstadium, der Malignitätsgrad (*Gleason Score*), der R-Status sowie der perioperative PSA-Wert. Zusätzlich existieren weitere Faktoren, deren prognostische Bedeutung diskutiert, jedoch statistisch noch nicht ausreichend belegt worden ist. Hierzu zählen u.a. der histologische Typ und das Tumolvolumen (78). Dennoch gelingt es auch durch die Summe dieser Faktoren nach wie vor nicht, den individuellen Krankheitsverlauf hinreichend zu prognostizieren.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Mikrogefäßdichte, die vaskuläre Gefäßfläche und die Abstände der Mikrogefäße als Parameter der Angiogenese auf ihre prognostische Bedeutung beim Prostatakarzinom untersucht. Des Weiteren sollte der Einfluss des Angiogenese-Inhibitors Maspin auf Angiogenese und Überlebenszeit der Patienten betrachtet werden. Hierbei wurden die klinischen und histologischen Daten von insgesamt 61 Patienten, die im Zeitraum von 1993 bis 2002 behandelt wurden, verwendet.

6.1. Die klinischen Parameter als Prognosefaktoren

Wir konnten aufzeigen, dass das Alter eines Patienten mit Prostatakarzinom keinen wesentlichen Einfluss auf seine Prognose nach einer Prostata-Operation hat. Dieser Zusammenhang konnte auch in der Literatur mehrfach belegt werden (79, 80). Beim Tumorstadium ergaben sich folgende Ergebnisse: Der T-Status stellte sich als ein statistisch hochsignifikanter Parameter hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit dar, für den Nodalstatus wurde diesbezüglich lediglich eine Tendenz, aber keine Signifikanz nachgewiesen. Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der ungünstigen Verteilung der einzelnen Stadien: Insgesamt 50 Patienten wiesen Status N0, 7 Patienten Status N1 und 3 Patienten Status N2 auf. Wegen dieser Verteilung besitzen die Ergebnisse somit nur geringe Aussagekraft und die fehlende Signifikanz lässt sich dadurch erklären. Das Vorhandensein von mikroskopischen Residualtumoren stellte sich als signifikant hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit heraus. Die Ergebnisse früherer Studien hinsichtlich der

drei aufgeführten Parameter fallen unterschiedlich aus: So konnten Bettencourt et al., Boore et al. und Weidner et al. eine Korrelation des Tumorstadiums mit dem Überleben aufzeigen (44, 81, 82), während Rubin et al. und Silberman et al. ebendies in ihren Studien widerlegen (50, 83). Eine eindeutige Aussage bezüglich einer Korrelation zwischen Tumorstadium und Überleben ist also nach wie vor noch nicht möglich. Der *Gleason Score* stellte sich in unserer Arbeit einerseits als ein statistisch signifikanter Parameter bezüglich des rezidivfreien Überlebens dar, andererseits wurde jedoch keine signifikante Korrelation hinsichtlich des Gesamtüberlebens nachgewiesen. Die Signifikanz angesichts des rezidivfreien Überlebens verhält sich adäquat zu zahlreichen früheren Untersuchungen (44, 81, 83) und bestätigt damit die hohe prognostische Aussagekraft des *Gleason Score*. Die fehlende Korrelation des *Gleason Score* bezüglich des Gesamtüberlebens erscheint damit umso widersprüchlicher. Als Ursache für dieses Ergebnis kann u.a. das oft sehr heterogene Erscheinungsbild der Prostatakarzinome verantwortlich gemacht werden, was evtl. zu einer anderen Einstufung der *Gleason* Grade geführt haben könnte (84).

Auch der präoperative PSA-Wert stand in unseren Studien in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang zum Gesamtüberleben und deckt sich damit mit den Untersuchungen von Smaletz et al. und Noguchi et al. (85, 86). Dennoch wurde bis heute schon in mehreren Studien der Zusammenhang zwischen PSA-Wert und der Überlebenszeit nachgewiesen (87, 88, 89), so dass der präoperative PSA-Wert mittlerweile als prognostischer Parameter beim Prostatakarzinom anerkannt ist. Als Ursachen für die fehlende Korrelation kommen mehrere Faktoren in Frage: Eine vorliegende benigne Prostatahyperplasie (BPH) könnte einen PSA-Anstieg verursachen, die Höhe des PSA-Wertes ist also nicht zwingend karzinom-spezifisch. Des Weiteren können Entzündungen oder Infektionen der Prostata, Geschlechtsverkehr, Fahrradfahren oder auch eine rektale Untersuchung der Prostata den PSA-Wert in die Höhe schnellen lassen (90). Das Vorhandensein bzw. Fehlen eines Rezidivtumors erwies sich, wie nicht anders zu erwarten, als höchst signifikant. Viele Studien (91, 92) belegen, dass durch eine Hormonentzugstherapie die Überlebenszeit von Patienten, die an einem Prostatakarzinom erkrankt sind, verlängert werden kann. In unserer Arbeit konnte diese These jedoch nicht bestätigt werden, ein signifikanter Zusammenhang wurde nicht nachgewiesen. Die Gründe hierfür liegen wohl zum Einen an der

relativ geringen Anzahl an Patienten, die einer Hormonentzugstherapie unterzogen wurden (34), so dass unsere Studie diesbezüglich nur geringe Aussagekraft besitzt. Zum Anderen erfolgte keine einheitliche Durchführung der Therapie (21 Patienten wurden perioperativ, 13 Patienten nur postoperativ behandelt), bzw. die Therapiedauer schwankte bei den einzelnen Patienten erheblich (1-168 Monate), so dass der jeweilige Nutzen der Hormonentzugstherapie in unserer Studie nur schwierig abzuschätzen war. Der Komorbiditätsfaktor Hypertonie hatte in unserer Studie keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten.

6.2. Morphometrische Auswertung der Tumervaskularisation und Korrelation der Gefäßparameter

Bereits 1998 stellten Zlotta et al. fest, dass die Tumervaskularisation bei soliden Tumoren mit der Tumorprognose korreliert (93). Diese Erkenntnis sollte in unserer Studie abermals überprüft werden. Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (50, 81, 94, 95) wurde auch in unserem Fall die Vaskularisation der Prostatakarzinome anhand von Prostatektomiepräparaten untersucht.

Bei der Gefäßanzahl ergab sich für den Marker FVIII ein Mittelwert von 16,5. Demgegenüber wurden für den Antikörper CD31 durchschnittlich 20,2 und für den Antikörper CD105 durchschnittlich 17,1 Blutgefäße gezählt. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen von Gasparini et al. und Toi et al., dass CD31 ein sehr sensibler Marker ist (96, 97). De Jong et al. sind der Ansicht, dass der Marker FVIII zwar eine geringe Sensitivität, aber dafür eine höhere Spezifität aufweist als CD31 (98), was wiederum unseren Ergebnissen entspricht. Im Unterschied zu den Panendothelmarkern FVIII und CD31, welche auch vom Tumor inkorporierte Blutgefäße und somit fast alle Gefäße färben, werden vom Antikörper CD105 nur angiogen „aktive“ Endothelzellen markiert (63). Somit lässt sich die geringere durchschnittliche Anzahl an markierten Blutgefäßen von CD105 gegenüber CD31 erklären. Dass für CD105 jedoch mehr Gefäße gefärbt wurden als bei FVIII erscheint ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung liefern Wang et al., die festgestellt haben, dass Panendothelmarker wahrscheinlich mit Tumorgefäßen

nicht so gut reagieren wie mit normalen Endothelien (99). Als weitere Fehlerquellen kommen u.a. schlechte Färbungen, die Auswahl der *hot spots* oder auch das manuelle Zählverfahren in Frage. Anschließend sollen die durchschnittlichen Gefäßflächen der drei Marker verglichen werden: Für FVIII und CD31 betrug die Gefäßflächen durchschnittlich jeweils 4,8 Prozent der ausgewerteten Fläche. Die Fläche von Antikörper CD105 lag mit einem Mittelwert von 2,8 Prozent deutlich unter seinen beiden Vorgängern. Als Ursachen für diese Ergebnisse können zum einen für den Marker CD31 die höhere Gefäßanzahl aufgeführt werden, und zum anderen die Erkenntnis, dass die Panendothelmarker FVIII und CD31 eher größere Gefäße anfärben (99). Die Ergebnisse der Gefäßabstände der drei Antikörper folgen den vorhergehenden Statistiken: Aufgrund der größeren Anzahl an gefärbten Blutgefäßen (CD31) bzw. der größeren Gefäßflächen (FVIII, CD31) liegen folgerichtig die durchschnittlichen Gefäßabstände von FVIII (81,7µm) und CD31 (72,4µm) niedriger als bei CD105 (86,0µm). Weil der Antikörper CD31, wie von Gasparini et al. und Toi et al. beschrieben, der Marker mit der höchsten Sensitivität von allen ist, und damit die weitaus höchste Gefäßanzahl aufwies, konnte hier der mit Abstand niedrigste Wert ermittelt werden (96, 97).

Als nächster Schritt soll die Korrelation der drei Gefäßparameter untereinander beleuchtet werden: Bei insgesamt 9 Vergleichen konnten lediglich zwei Signifikanzen festgestellt werden. Hierbei erwies sich die Gefäßanzahl der beiden Marker FVIII und CD31 als höchst signifikant sowie die Gefäßabstände der beiden Marker CD31 und CD105 als hoch signifikant. Sowohl FVIII als auch CD31 gelten als panendotheliale Marker, so dass die Korrelation bei der Gefäßanzahl zumindest teilweise den ähnlichen Eigenschaften der beiden Marker zugeschrieben werden kann. Eine Erklärung für die Signifikanz zwischen CD31 und CD105 bei den Gefäßabständen kann hier jedoch nicht gegeben werden. Insgesamt muss jedoch festgehalten werden, dass Korrelationen der Gefäßparameter untereinander kaum nachweisbar waren. Diese Tatsache kann durch die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Antikörper erklärt werden: Wie bereits erwähnt zählt der Antikörper FVIII zu den panendothelialen Markern (63), es werden also sowohl neu gebildete Blutgefäße als auch vom Tumor inkorporierte Gefäße angefärbt. Darüber hinaus stellten Hannah et al. jedoch fest, dass zu einem geringen Anteil auch Lymphgefäße miterfasst werden

(100), was zwangsläufig zu anderen Ergebnissen führen muss. Im Vergleich zu CD31 weist FVIII eine geringere Sensitivität, aber auch eine höhere Spezifität auf (98). Lackner et al. waren sogar der Meinung, dass der Marker FVIII in der Detektion weniger geeignet sei als andere Antikörper (101). Auch CD31 gilt als panendothelialer Marker und zugleich als der sensitivste aller drei hier verwendeten Marker (96, 97). Nach Ansicht von Weidner et al. gilt der Antikörper CD31 als zuverlässig, jedoch zeigt sich u.a. eine positive Reaktion mit Plasmazellen, so dass in Tumoren mit hohem Plasmazellanteil Mikrogefäße maskiert werden können (44). Außerdem haben Wang et al., wie bereits beschrieben, in früheren Studien erkannt, dass die beiden Panendothelmarker FVIII und CD31, im Gegensatz zu CD105, eher größere Gefäße anfärben (99). Der Antikörper CD105 markiert laut Kumar et al. nur angiogen „aktive“ Endothelzellen (63) und damit bedeutend weniger Blutgefäße als seine beiden Vorgänger. Aus diesem Grund soll Anti-CD105 den anderen beiden Markern bei der Analyse der Angiogenese auch überlegen sein (60). Jedoch haben Garlanda et al. sowie Rokhlin et al. festgestellt, dass CD105 auch von Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird (56, 102), wodurch die Ergebnisse wiederum verfälscht werden können. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede der drei Marker ist es also nicht verwunderlich, dass in unserer Analyse der Gefäßparameter kaum signifikante Korrelationen nachgewiesen werden konnten.

Im Anschluss sollte die Beziehung zwischen der Angiogenese und dem rezidivfreien sowie dem Gesamtüberleben eingehend betrachtet werden. Aus der Literatur sind zahlreiche Studien bekannt, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben: Bereits im Jahr 1993 haben Weidner et al. eine Korrelation zwischen Angiogenese und Tumorprogression festgestellt, indem sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Metastasierung von Prostatakarzinomen nachweisen konnten (44). Auch Wakui et al. haben sich mit der Metastasierung von Prostatatumoren beschäftigt und dabei ebenso eine Signifikanz zwischen Gefäßdichte und Metastasierung erkannt, allerdings nur bei gut bis mittelgradig differenzierten Tumoren (*Gleason Score* 2-7). Bei schlechter Differenzierung (*Gleason Score* 8-10) konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden (103). Boore et al. sind 1998 zu der Erkenntnis gekommen, dass Patienten mit hoher Gefäßdichte eine signifikant geringere rezidivfreie Überlebenszeit aufweisen als Patienten mit niedrigerer Gefäßdichte (82). Des Weiteren haben

Fregene et al. festgestellt, dass die Überlebensdauer von Patienten mit MVC<135 signifikant länger war als bei Patienten mit MVC>135. Sowohl Tumorstadium als auch Gefäßanzahl hatten in ihren Untersuchungen beim Prostatakarzinom einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (104). Neben diesen Studien existieren noch viele weitere, die eine signifikante Korrelation zwischen Angiogenese und Überleben der Patienten belegen (47, 94, 105), so dass dieser Zusammenhang heute weitgehend als anerkannt gilt. Im Gegensatz zu den genannten früheren Studien konnten in unserer Arbeit jedoch keinerlei signifikante Korrelationen zwischen den Gefäßparametern und dem rezidivfreien Überleben nachgewiesen werden. Derartige Ergebnisse sind zwar auch in anderen Studien in der Literatur zu finden (49, 50, 81), die Ursachen für die Diskrepanz zu den Studien mit Signifikanz müssen dennoch diskutiert werden: So kommen in den Untersuchungen immer wieder unterschiedliche Färbemethoden und Antikörper zum Einsatz, die eingesetzten Präparate sind häufig unterschiedlich alt, die Fixationsverfahren oft verschieden und die Reaktions-freudigkeit der verwendeten Antikörper ist häufig nicht dieselbe. Als weiterer Einflussfaktor zählt die Größe des mikroskopischen Sehfeldes: Während Fox et al. von um 50 % niedrigeren Werten pro mm² bei Quantifizierungen in Sehfeldern von 0,85mm² versus 0,16mm² berichten (106), gaben Horak et al. nach ihren Untersuchungen Differenzen von 15-32 % bei Sehfeldern von 0,38mm² versus 0,2mm² an (107). Als Erklärung geben die Autoren an, dass bei hohen, zum Beispiel 400-fachen Vergrößerungen und damit kleinen Sehfeldern die meisten Gefäße identifiziert werden können. Im Gegensatz dazu werden in größeren Sehfeldern neben dem vaskulären *hot spot* in einem Teil des Sehfeldes auch gefäßärmere Gebiete mit erfasst. Mit sinkender Sehfeldgröße kommt es somit zu einer zunehmenden „Verdünnung“ des *hot spots* (106, 108), was sich damit direkt auf die Gefäßzählung auswirkt. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Auswahl der *hot spots* an sich dar. Auch wenn dieses Verfahren in vielen Studien bereits verwendet worden ist zur Bestimmung von Gefäßanzahl oder -dichte, so bezeichnen Weidner et al. diese Methode als sehr subjektiv, weil damit nur einige „repräsentative“ Areale eines Tumors in die Auswertungen mit eingehen (45). Nach Ansicht mehrerer Autoren ist die Identifikation eines *hot spots* auch nicht immer reproduzierbar (109, 110) und zudem stark von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängig (111, 112, 113, 114). So haben z.B. Untersuchungen am Mammakarzinom ergeben, dass die

Mikrogefäßdichten bei der Auswertung eines Tumorschnittes zwischen 5 und 10 Prozent abweichen (98). Zwischen den verschiedenen Tumorschnitten innerhalb eines Tumorblockes betragen die Abweichungen ca. 11 Prozent (98, 110) und zwischen den verschiedenen Tumorblöcken eines Tumors sogar zwischen 15 und 30 Prozent (98, 115). Zum Abschluss muss noch die Identifikation der Blutgefäße kritisch hinterfragt werden: Das Erkennen der Gefäße erfolgt jeweils subjektiv nach Ermessen und Erfahrung des Betrachters. Dabei werden oft alle markierten Strukturen als Blutgefäße gewertet, auch wenn oft kein Lumen erkennbar ist oder nichtendotheliale Bereiche durch Antikörper angefärbt worden sind. Des Weiteren fällt bei manchen Tumorschnitten die Zuordnung nebeneinander liegender Strukturen oft schwer: Sollen benachbarte Strukturen als einzelne Gefäße gewertet werden oder gehören sie zu einem einzigen Gefäß, das ungünstig in seinem Querschnitt erfasst worden ist? Die Ergebnisse der Gefäßzählungen können dadurch variieren. Eine Verbesserung könnte z.B. durch die Einführung automatisierter Zählverfahren erfolgen, was in früheren Studien bereits angewendet worden ist (49, 94).

Die große Anzahl der aufgezeigten möglichen Fehlerquellen lässt unsere Ergebnisse etwas verständlicher erscheinen. Um künftige Studien weniger subjektiv gestalten zu können, sind einheitliche Richtlinien und Verfahren notwendig. Diesbezüglich sind entsprechende Konsensus-Richtlinien bereits erarbeitet worden (112). Nur so können vergleichbare Ergebnisse zustande kommen.

6.3. Maspinexpression und Korrelation mit Gefäßparametern und Überleben

In unserer Studie wurde außerdem die Korrelation zwischen Maspinexpression und rezidivfreiem sowie Gesamtüberleben untersucht. In keiner der beiden Untersuchungen konnten signifikante Ergebnisse nachgewiesen werden. Damit verhalten sich unsere Ergebnisse konträr zu einer Studie von Machtens et al., die ihrerseits nachweisen konnten, dass eine verminderte Expression des Angiogenesehemmers Maspin mit einer erhöhten Vaskularisation und einer Verschlechterung der Prognose beim Prostatakarzinom einhergeht (39, 116).

Auch Zou et al. berichten, dass über eine Induktion von Maspin und anderen antiangiogenen Faktoren in Tumorzellen die gezielte Neubildung von Blutgefäßen verhindert wird, wodurch es zu einer Reduktion der Tumorgroße kommt. Die Wahrscheinlichkeit einer hämatogenen Metastasierung soll dadurch kleiner werden, weil Tumorzellen bei reduzierter oder gar fehlender Vaskularisation den Zellverbund schlechter verlassen können (117). Ebenso wurde von Maass et al. für Maspin ein hemmender Effekt auf die Angiogenese und Tumordinvasion beschrieben (118). Folglich sollte durch diese antiangiogenen Eigenschaften die Prognose der Patienten bei erhöhter Maspinexpression verbessert sein. Diese Thesen können durch unsere Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung lässt sich aus den verschiedenen Nachweisreaktionen von Maspin ableiten: Manche Methoden zeigen eine ausgesprochen hohe Sensitivität, so dass beispielsweise auch bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen eindeutig eine Maspinexpression nachgewiesen werden konnte (119). Auch andere Autoren haben in ihren Studien von falsch-positiven Ergebnissen berichtet: So konnte die Expression von Maspin u.a. auch im Blut von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen oder auch in Lymphknotenmetastasen gefunden werden (120, 121). Als weitere Fehlerquellen können schlechte Färbungen, die Interpretation der Färbung in Abhängigkeit von der genauen Lokalisation oder auch die Bewertung der Farbintensität, und damit die definitive Einteilung in Maspin positiv oder Maspin negativ, diskutiert werden. Dass der Maspinexpression allgemein eine hohe prognostische Aussagekraft zugeschrieben werden kann, wurde in zahlreichen Studien belegt. So konnten bislang beim Bronchialkarzinom (122), dem Larynxkarzinom (123), dem Mammakarzinom (42, 124, 125, 126) und dem oralen Plattenepithelkarzinom (127, 128) signifikante Korrelationen zwischen Maspinexpression und Überleben oder Metastasierung nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen Maspinexpression und Tumorprogression scheint jedoch auch vom Tumortyp und der genauen Lokalisation der Maspinfärbung abhängig zu sein: In der Literatur wird beschrieben, dass ein vermehrter Anteil an zytoplasmatischem Maspin mit der Tumorprogression korreliert (124, 125, 126), während eine höhere Expression von nukleärem Maspin mit einer positiven Prognose einhergeht (124). Die Notwendigkeit nach standardisierten Richtlinien und Verfahren wird auch hier deutlich, um die Möglichkeiten des Angiogenese-Inhibitors Maspin weiter erforschen und besser einschätzen zu können.

Abschließend wurde in unserer Arbeit noch ein möglicher Zusammenhang zwischen der Maspinexpression und den Gefäßparametern überprüft. Bei insgesamt 9 Vergleichen konnte lediglich eine einzige signifikante Korrelation zwischen der Maspinexpression und den Gefäßabständen des Antikörpers CD31 festgestellt werden. Aufgrund der in unserer Studie nicht vorhandenen Zusammenhänge zwischen den Gefäßparametern der einzelnen Antikörper und dem Überleben bzw. zwischen der Maspinexpression und dem Überleben der Patienten, sind diese Ergebnisse nicht verwunderlich. Die nicht vorhandenen Korrelationen sind mit den multiplen Fehlerquellen verknüpft, welche bereits in den Gliederungspunkten 6.2 und 6.3 ausführlich beschrieben worden sind.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann noch keine eindeutige Aussage über die prognostische Bedeutung der Angiogenese beim Prostatakarzinom gemacht werden. Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit vielen anerkannten Untersuchungen nicht überein. Ob Gefäßanzahl, -fläche und -abstände als Parameter für die Angiogenese in Zusammenhang mit der Prognose beim Prostatakarzinom stehen, konnte bisher noch nicht hinreichend geklärt werden. Zur Beantwortung dieser Frage sollten weitere Studien nach standardisierten Richtlinien und Verfahren durchgeführt werden, damit eine möglichst hohe Vergleichbarkeit untereinander garantiert werden kann.

8. Tabellen

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten (1)

Patienten ID	Alter bei Diagnose	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	R-Stadium	Stadium
# 1	73	pT3b	0	0	1	2
# 2	63	pT2b	0	0	0	2
# 3	65	pT2c	0	0	0	2
# 4	49	pT3a	0	0	1	2
# 5	49					
# 6	71	pT3a	0	0	1	2
# 7	73	pT2b	0	0	0	2
# 8	62	pT3b	0	0	1	2
# 9	70	pT3b	0	x	1	2
# 10	66	pT3b	1	0	0	2
# 11	55	pT3	2	0	1	3
# 12	71	pT3c	0	0	1	3
# 13	60	pT2a	0	0	0	2
# 14	74	pT3	1		1	3
# 15	61	pT2b	0		1	2
# 16	55	pT3a	2		1	3
# 17	68	pT2b	0		0	2
# 18	59	pT3b	0		1	2
# 19	58	pT2b	0		0	2
# 20	52	pT2c	0		0	2
# 21	53	pT3b	0		0	2
# 22	67	pT3c	0		0	2
# 23	51	pT3a	0		1	2
# 24	62	pT3b			1	2
# 25	60	pT2a	0		0	1
# 26	67	pT3b	1		1	3
# 27	58	pT2a	0		0	2
# 28	75	pT3b	0		1	2
# 29	69	pT3	0		0	2
# 30	62	pT3b	0		1	2
# 31	67	pT2b	0		0	2
# 32	63	pT3b	1		1	2
# 33	60	pT2c	0		0	2
# 34	67	pT3b	0		1	2
# 35	62	pT3b	0		1	2
# 36	72	pT2b	2		1	2
# 37	70	pT2c	0		0	2
# 38	68	pT3a	0		1	2
# 39	62	pT3	0		1	3
# 40	70	pT3a	0		0	2
# 41	65	pT1a	0		0	1
# 42	54	pT3a	0		0	2
# 43	63	pT3b	0		1	3
# 44						
# 45	69	pT2c	0		0	2
# 46	72	pT3b	0		1	3
# 47	67	pT2c	0		0	2
# 48	65	pT2a	0		0	3
# 49	49	pT2a	0		0	2
# 50	58	pT2b	0		0	2
# 51	68	pT3b	0		1	2
# 52	70	pT2b	0		0	3
# 53	56	pT2a	0		0	2
# 54	60	pT2c	0		0	2
# 55	67	pT3a	0	0	0	2
# 56	69	pT3b	0	0	0	3
# 57	59	pT3b	1	0	1	4
# 58	70	pT3b	0	0	0	2
# 59	68	pT3a	1	0	1	3
# 60	63	pT2c	0	0	0	2
# 61	63	pT3a	0	0	1	3
# 62	65	pT2c	0	0	0	2

Tabelle 2: Klinische Daten der Patienten (2)

Patienten ID	Gleason Score	Gleason grading	PSA bei Diagnose (oder vor OP)	PSA Wert (nach OP)	Zeit bis zum erneuten PSA-Wert Auftritt (in Monaten)	OP-Technik	Rezidiv in den ersten Jahren
# 1	2		21,7	21,7	20	Rpe	Ja
# 2	5	3+2	17,6	17,6	24	Rpe	Ja
# 3			52,07	52,07	36	Rpe	Ja
# 4	6	3a+3c	9,8	9,8	5	Rpe	Ja
# 5							
# 6	7	3+4	6,7	6,7	12	Rpe	Ja
# 7	5	3+2	8,3	2,8	24	Rpe	Ja
# 8	6	4+2	10,4	10,4	4	Rpe	Ja
# 9	7	4+3	5,7	5,7	5	Rpe	Ja
# 10	7	3+4	3,7	10,56	25	Rpe	Ja
# 11			35	87	1	Rpe	Ja
# 12	9		20,1	20,1	28	Rpe	Ja
# 13	5	3+2	5,7	5,7	36	Rpe	Ja
# 14	9	5+4					
# 15	4	2+2	5,7			Rpe	Nein
# 16			19,97			Rpe	Nein
# 17	5	3+2	16,31			Rpe	Nein
# 18	6	4+2	8,4			Rpe	Nein
# 19	4	3+1	13,35			Rpe	Nein
# 20			11,36			Rpe	Nein
# 21	6	2+4	7,3			Rpe	Nein
# 22	7	2+5	21,38			Rpe	Nein
# 23						Rpe	Nein
# 24	6	4+2	34,6			Rpe	Nein
# 25			2,02			Rpe	Nein
# 26	9	5+4	17,4			Rpe	Nein
# 27						Rpe	Nein
# 28	5	3+2	12,58			Rpe	Nein
# 29			6,4			Rpe	Nein
# 30	5	3+2	6,1			Rpe	Nein
# 31	5	3+2	8,03			Rpe	Nein
# 32	8	3+5	24,76			Rpe	Nein
# 33	7	4+4	9			Rpe	Nein
# 34	10	5+5	3,8			Rpe	Nein
# 35	7		48,4			Rpe	Nein
# 36			39,1			Rpe	Nein
# 37	5	2+3	2,87			Rpe	Nein
# 38	6	4+2	5,52			Rpe	Nein
# 39			37,1			Rpe	Nein
# 40	7	3+4	5,7			Rpe	Nein
# 41			0,78			Rpe	Nein
# 42	5	2+3				Rpe	Nein
# 43						Rpe	Nein
# 44							
# 45	3	2+1	4,08			Rpe	Nein
# 46	9	4+5	1,26			Rpe	Nein
# 47	6	4+2	18,7			Rpe	Nein
# 48	8	5+3	7,63			Rpe	Nein
# 49	5	3+2	0,36			Rpe	Nein
# 50	5	3+2	9,22			Rpe	Nein
# 51	5	3+2	4,88			Rpe	Nein
# 52	8	5+3	25,02			Rpe	Nein
# 53	5	2+3	4,9			Rpe	Nein
# 54	8	4+4	9			Rpe	Nein
# 55	8	4+4	17	1,12	3	Rpe	Ja
# 56	9	4+5	21	3,5	3	Rpe	Ja
# 57	8	4+4	28	1,3	3	Rpe	Ja
# 58	8	4+4	12	5,8	6	Rpe	Ja
# 59	9	4+5	6,3	4,2	3	Rpe	Ja
# 60	7	3+4	15	1,2	3	Rpe	Ja
# 61	7	3+4	5,9	1,2	3	Rpe	Ja
# 62			34	4,3	3	Rpe	Ja

Tabelle 3: Klinische Daten der Patienten (3)

Patienten ID	Zeit bis erneuter Auftritt	Hormonelle Behandlung	Dauer der Beh. (in Monaten)	Wirkung der Behandlung	Weitere klinische Erkrankungen
# 1	18	Hodenentfernung		Unbekannt	
# 2	132	Flutamid, Enantone		Teilweise	Bluthochdruck
# 3	132	Trenantone	168	Teilweise	
# 4	24	Casodex	19	Vollständig	
# 5					
# 6	20				
# 7	32				Bluthochdruck
# 8	6	Enantone, Casodex	2	Unbekannt	Apoplex
# 9	18	Trenantone	13	Vollständig	
# 10	66	Enantone	64	Teilweise	
# 11	32	Allvoran, Helix, Hodenentfernung	31	Keine	
# 12	36	Casodex	38	Keine	Herzerkrankung
# 13	60	Unbekannt			Bluthochdruck
# 14					
# 15	70				
# 16	91	Fugerel, Zoladex, LHRH	periop.		Bluthochdruck
# 17	67				
# 18	69	Fugerel, Trenantone	periop.		
# 19	72				
# 20	117				
# 21	61				
# 22	79				
# 23	69	Hodenentfernung	periop.		Bluthochdruck Hyperurikämie
# 24	69	Hodenentfernung	periop.		Bluthochdruck
# 25	121	Enantone, Fugerel	periop.		
# 26	67				
# 27	100				
# 28	55	Trenantone			
# 29	83				
# 30	72	Zoladex	periop.		Bluthochdruck Hyperurikaemie
# 31	65				
# 32	63	LHRH	periop.		
# 33	81				
# 34	70	Enantone	periop.		Bluthochdruck
# 35	95	Fugerel	periop.		Bluthochdruck
# 36	140	Hodenentfernung	periop.		
# 37	89	Zoladex, Fugerel	periop.		
# 38	67				Bluthochdruck Hyperurikämie
# 39	119	Zoladex, Fugerel	periop.		Bluthochdruck
# 40	71	Zoladex	periop.		
# 41	95	Enantone, Fugerel	periop.		
# 42	73				
# 43	70	Antiandrogen	periop.		Fettleber
# 44					
# 45	79	Fugerel, Enantone	periop.		
# 46	81	Casodex	82	Vollständig	Bluthochdruck
# 47	71	Casodex, LHRH	periop.		
# 48	60	LHRH	periop.		
# 49	59	Flutamid	periop.		
# 50	65				
# 51	67	Hodenentfernung			Bluthochdruck Haemosiderose
# 52	60	Zoladex	periop.		
# 53	63	LHRH	periop.		
# 54	81			Vollständig	Bluthochdruck
# 55	12	LHRH	periop.	Teilweise	
# 56	12	LHRH	periop.	Unbekannt	Bluthochdruck
# 57	12	LHRH	periop.	Teilweise	
# 58	6	LHRH	periop.	Keine	
# 59	12	LHRH	periop.	Unbekannt	Herzerkrankung
# 60	6			Keine	
# 61	6			Keine	Bluthochdruck
# 62	6	LHRH	periop.	Keine	

Tabelle 4: Durchschnittliche Gefäßanzahl im Tumor- bzw. Normalgewebe

Patienten ID	Mittelwerte: Microvessel Count (MVC)					
	FVIII Tumor	FVIII Normal	CD31 Tumor	CD31 Normal	CD105 Tumor	CD105 Normal
# 1	13.8	11.5	32.7	16.0	excl.	excl.
# 2	12.8	7.0	11.2	6.0	13.3	7.2
# 3	28.5	7.5	excl.	excl.	18.2	6.5
# 4	28.7	10.5	18.7	18.0	16.6	11.5
# 5	23.50	9	14.8	7.0	9.2	16.0
# 6	12.2	7.5	13.5	10.5	13.4	7.5
# 7	11.3	10.5	13.4	9.5	15.6	10.0
# 8	8.7	5.5	excl.	excl.	20.6	6.0
# 9	15.3	5.5	21.2	8.5	15.4	14.0
# 10	11.3	5.0	17.8	18.0	10.0	5.5
# 11	17.7	5.0	25.2	16.5	32.8	13.0
# 12	17.3	12.0	13.3	8.5	excl.	excl.
# 13	20.3	7.0	45.8	9.0	excl.	excl.
# 14	17.0	10.0	24.5	12.7	16.7	11.5
# 15	15.5	7.0	17.2	18.0	21.7	12.5
# 16	17.4	8.0	excl.	excl.	9.7	9.0
# 17	10.3	11.0	excl.	excl.	12.3	6.5
# 18	17.2	10.0	22.5	14.0	32.3	9.0
# 19	14.2	7.5	15.3	8.0	17.7	9.5
# 20	18.2	12.0	17.8	17.5	14.0	13.5
# 21	14.2	4.5	21.5	6.0	20.8	6.5
# 22	11.3	9.0	15.8	13.5	18.4	10.0
# 23	27.0	9.5	26.2	9.5	19.2	15.0
# 24	16.8	10.5	13.3	7.0	24.2	5.0
# 25	25.7	7.0	43.2	16.5	19.0	17.0
# 26	15.7	3.5	22.0	14.0	19.2	6.0
# 27	16.7	6.0	17.2	9.0	14.2	14.0
# 28	17.2	12.5	16.4	8.0	7.4	11.0
# 29	15.3	5.5	9.6	15.0	21.8	9.3
# 30	12.7	7.5	15.2	8.0	17.0	6.5
# 31	13.5	5.5	16.0	8.5	9.0	8.0
# 32	14.3	15.0	27.3	15.0	19.4	13.5
# 33	11.0	6.5	17.3	8.5	excl.	excl.
# 34	12.0	11.0	16.3	12.5	16.6	11.5
# 35	26.3	9.5	26.2	21.5	excl.	excl.
# 36	excl.	excl.	13.0	6.0	17.4	11.0
# 37	11.8	8.0	14.0	5.0	15.0	7.5
# 38	10.2	13.0	19.0	12.0	8.6	11.0
# 39	10.7	10.0	23.0	11.5	25.6	13.0
# 40	21.50	15	22.5	7.5	14.6	12.5
# 41	excl.	excl.	excl.	excl.	excl.	excl.
# 42	22.3	4.5	33.5	7.5	excl.	excl.
# 43	17.4	9.5	29.7	13.5	18.0	19.0
# 44	18.3	15.0	22.8	10.5	15.2	6.5
# 45	14.2	5.0	12.2	5.0	10.0	16.5
# 46	24.8	18.7	excl.	excl.	29.2	8.0
# 47	11.7	8.5	14.2	5.5	21.2	8.5
# 48	12.2	14.5	17.7	9.0	excl.	excl.
# 49	13.7	10.0	17.4	8.0	19.6	10.0
# 50	14.7	9.0	15.7	7.0	9.0	11.5
# 51	11.6	6.5	19.7	18.5	12.8	6.5
# 52	21.0	8.5	16.0	8.5	21.2	13.5
# 53	14.8	11.0	22.5	10.5	17.0	6.0
# 54	7.8	6.0	25.3	12.5	16.7	9.0
# 55	32.0	18.0	32.8	20.5	excl.	excl.
# 56	17.0	8.5	21.5	8.5	excl.	excl.
# 57	18.5	13.0	11.3	13.0	excl.	excl.
# 58	19.0	16.5	17.0	13.5	excl.	excl.
# 59	13.5	7.5	18.3	8.5	excl.	excl.
# 50	12.5	8.5	30.0	10.5	excl.	excl.
# 61	13.8	12.0	excl.	Excl.	excl.	excl.
# 62	17.0	6.0	17.3	10.5	excl.	excl.

Tabelle 5: Durchschnittliche Gefäßfläche im Tumor- bzw. Normalgewebe (in Prozent)

Patienten ID	Mittelwerte: Vascular Surface Area (VSA)					
	FVIII Tumor	FVIII Normal	CD31 Tumor	CD31 Normal	CD105 Tumor	CD105 Normal
# 1	4.0	5.8	3.8	3.9	excl.	excl.
# 2	6.1	15.9	3.7	4.0	2.3	4.5
# 3	5.7	4.4	excl.	excl.	1.8	3.4
# 4	3.3	17.6	5.1	4.8	2.4	3.5
# 5	5.7	24.1	5.4	9.6	5.8	5.0
# 6	5.7	13.5	5.6	6.4	1.9	12.6
# 7	5.6	12.4	3.6	5.5	1.1	7.3
# 8	5.8	8.9	excl.	excl.	2.0	8.2
# 9	5.3	7.1	3.7	6.0	3.8	4.7
# 10	7.0	10.9	4.9	3.0	2.9	18.1
# 11	4.0	19.1	4.9	3.2	2.5	3.6
# 12	4.0	14.2	2.0	2.6	excl.	excl.
# 13	7.8	7.0	5.0	3.8	excl.	excl.
# 14	6.1	5.7	4.2	4.1	3.9	7.6
# 15	6.0	8.0	4.1	2.4	6.6	8.2
# 16	4.1	13.4	excl.	excl.	2.0	4.0
# 17	5.1	14.6	excl.	excl.	1.6	10.3
# 18	4.9	10.7	5.0	15.5	2.4	12.8
# 19	3.9	17.5	4.0	9.4	3.2	12.3
# 20	2.7	6.6	4.5	15.5	3.7	7.1
# 21	4.6	17.8	4.7	10.4	2.5	9.0
# 22	3.7	12.9	4.0	8.2	2.1	9.0
# 23	4.9	14.6	4.7	6.5	2.7	6.1
# 24	6.0	13.6	4.6	18.8	2.5	5.0
# 25	2.5	7.6	3.6	3.8	2.9	3.1
# 26	5.8	4.4	2.9	5.9	1.8	6.3
# 27	6.9	16.1	4.4	2.4	4.7	17.9
# 28	4.6	7.2	3.6	7.2	2.0	3.1
# 29	5.9	15.7	6.7	3.1	1.5	5.1
# 30	3.0	13.0	6.3	7.6	3.5	26.9
# 31	4.1	7.3	3.9	4.3	2.4	4.4
# 32	3.9	6.2	4.6	4.8	1.4	6.2
# 33	3.8	10.9	5.4	9.2	excl.	excl.
# 34	4.6	13.8	7.0	5.0	3.3	5.9
# 35	5.1	10.3	5.5	6.6	excl.	excl.
# 36	excl.	11.7	4.9	9.5	1.6	3.7
# 37	4.5	21.1	5.3	3.9	4.1	7.5
# 38	5.6	13.2	5.2	8.4	3.9	13.4
# 39	5.6	11.0	3.4	10.2	3.0	12.7
# 40	8.0	8.0	5.6	5.9	1.6	8.4
# 41	excl.	14.1	excl.	excl.	excl.	excl.
# 42	3.0	10.3	4.4	9.3	excl.	excl.
# 43	10.1	19.4	8.1	8.2	5.6	8.2
# 44	5.5	10.7	5.3	7.7	3.5	11.1
# 45	4.6	22.4	6.0	4.4	1.3	10.2
# 46	3.3	5.5	excl.	excl.	1.9	7.6
# 47	3.1	9.4	6.2	8.1	2.6	10.3
# 48	3.5	9.3	6.0	10.8	excl.	excl.
# 49	3.6	7.0	5.2	7.6	2.9	9.2
# 50	2.3	11.8	3.1	6.8	0.9	3.1
# 51	7.0	16.7	4.7	3.7	1.6	4.2
# 52	3.8	10.4	6.5	7.0	2.7	5.6
# 53	6.3	18.3	4.4	4.0	3.4	12.5
# 54	5.4	11.4	3.9	12.3	1.2	19.1
# 55	10.0	7.9	5.0	8.2	excl.	excl.
# 56	3.6	12.8	4.7	17.6	excl.	excl.
# 57	3.7	16.4	7.2	6.6	excl.	excl.
# 58	3.7	7.6	5.6	5.4	excl.	excl.
# 59	3.1	6.1	1.4	5.5	excl.	excl.
# 50	2.1	8.9	4.0	2.5	excl.	excl.
# 61	2.2	17.9	Excl.	excl.	excl.	excl.
# 62	3.9	12.3	4.2	13.3	excl.	excl.

Tabelle 6: Durchschnittliche Gefäßabstände im Tumor- bzw. Normalgewebe (in μm)

Patienten ID	Mittelwerte: Gefäßabstände (IVAS)					
	FVIII Tumor	FVIII Normal	CD31 Tumor	CD31 Normal	CD105 Tumor	CD105 Normal
# 1	83.10	69.43	66.78	65.99	excl.	excl.
# 2	96.28	74.74	83.00	110.49	excl.	excl.
# 3	59.57	115.28	excl.	excl.	88.31	118.20
# 4	62.66	78.83	71.38	65.94	79.21	97.45
# 5	65.32	57.25	86.67	49.62	93.12	61.35
# 6	101.00	67.88	78.34	61.24	100.94	67.87
# 7	88.14	77.69	75.96	94.14	95.89	75.17
# 8	84.41	49.66	excl.	excl.	75.65	91.15
# 9	66.75	92.28	64.60	77.59	85.17	85.40
# 10	80.12	99.76	65.10	73.95	89.65	80.51
# 11	69.64	68.77	61.37	72.50	67.99	65.74
# 12	70.27	64.64	82.08	91.32	excl.	excl.
# 13	69.03	76.29	46.25	87.61	excl.	excl.
# 14	73.13	74.41	61.95	77.10	87.20	77.81
# 15	81.36	114.35	66.36	64.43	65.53	76.38
# 16	74.28	89.38	excl.	excl.	93.06	85.90
# 17	101.08	62.28	excl.	excl.	102.97	95.35
# 18	79.12	93.30	60.93	53.31	78.03	86.39
# 19	101.76	57.82	75.71	62.69	74.97	84.04
# 20	83.14	60.80	61.19	42.89	93.62	91.28
# 21	90.90	88.78	65.39	61.05	74.67	112.91
# 22	97.91	59.90	84.51	51.42	90.16	76.86
# 23	83.82	65.92	60.00	71.39	78.95	66.04
# 24	74.44	66.26	83.50	77.40	73.85	118.63
# 25	70.99	77.52	66.04	74.41	91.04	69.59
# 26	76.13	135.75	81.43	107.36	87.66	91.02
# 27	71.52	71.22	64.72	78.05	79.59	57.16
# 28	74.61	55.03	91.44	129.78	127.90	91.99
# 29	81.47	103.73	96.44	89.49	98.60	104.41
# 30	89.16	47.79	61.36	68.27	82.68	47.67
# 31	85.47	105.34	77.40	119.49	98.41	127.35
# 32	88.38	58.61	64.06	94.27	79.38	61.39
# 33	95.80	77.05	66.31	90.74	excl.	excl.
# 34	83.00	65.17	74.19	108.16	75.17	77.28
# 35	67.82	37.36	62.17	64.40	excl.	excl.
# 36	excl.	excl.	83.32	118.78	92.75	79.62
# 37	93.77	81.63	74.19	90.99	80.99	75.55
# 38	90.38	53.65	67.22	60.72	99.05	94.16
# 39	98.07	88.72	86.97	93.24	76.64	68.90
# 40	70.15	77.64	70.90	80.89	82.86	76.84
# 41	excl.	excl.	excl.	excl.	excl.	excl.
# 42	71.84	84.40	65.79	79.51	excl.	excl.
# 43	72.94	41.16	59.57	65.75	excl.	excl.
# 44	81.84	55.47	62.18	57.15	74.30	82.10
# 45	84.57	56.48	61.70	106.94	90.61	68.42
# 46	70.00	72.17	excl.	excl.	87.54	97.77
# 47	75.15	46.84	66.64	78.02	82.61	56.52
# 48	97.60	71.91	62.93	70.66	excl.	excl.
# 49	85.33	68.64	71.57	47.32	69.20	84.15
# 50	84.95	53.05	82.88	111.69	99.44	87.20
# 51	87.88	70.36	65.72	80.90	89.12	99.58
# 52	66.09	67.68	81.84	109.30	83.72	86.02
# 53	76.54	48.34	62.96	76.14	80.80	101.80
# 54	96.65	90.64	57.57	71.93	77.31	70.50
# 55	66.75	80.47	72.22	78.90	excl.	excl.
# 56	66.67	109.89	80.36	99.63	excl.	excl.
# 57	84.00	72.20	104.51	107.35	excl.	excl.
# 58	95.83	63.60	77.49	93.87	excl.	excl.
# 59	114.04	131.47	91.12	99.08	excl.	excl.
# 60	89.90	98.85	71.95	99.41	excl.	excl.
# 61	93.02	70.47	excl.	excl.	excl.	excl.
# 62	79.84	100.07	76.67	95.97	excl.	excl.

Tabelle 7: Maspinexpression

Patienten ID	Maspin Ca %	Maspin Ca Intensität	IRS	Score	dichotom
# 1	60	2	6	2	1
# 2	20	3	3	1	0
# 3	0	0			
# 4	0	0	0	0	0
# 5	0	0	0	0	0
# 6	0	0	0	0	0
# 7	0	0	0	0	0
# 8					
# 9	40	3	6	2	1
# 10	80	3	12	4	1
# 11	70	1	3	1	0
# 12	0	0	0	0	0
# 13	0	0			
# 14	10	3	3	1	0
# 15	0	0	0	0	0
# 16	0	0	0	0	0
# 17	0	0	0	0	0
# 18	80	3	12	4	1
# 19	0	0	0	0	0
# 20	60	2	6	2	1
# 21	0	0	0	0	0
# 22	0	0	0	0	0
# 23	0	0			
# 24	0	0	0	0	0
# 25	0	0			
# 26	20				
# 27					
# 28	90	3	12	4	1
# 29	0	0	0	0	0
# 30	30	3	6	2	1
# 31	0	0	0	0	0
# 32	20	1	2	1	0
# 33	70	3	9	3	1
# 34	0	0			
# 35	0	0	0	0	0
# 36	0	0	0	0	0
# 37	0	0			
# 38	0	0	0	0	0
# 39	0	0	0	0	0
# 40	70	3	9	3	1
# 41	0	0			
# 42	0	0	0	0	0
# 43	0	0	0	0	0
# 44	70	3	9	3	1
# 45	80	3	12	4	1
# 46	70	3	9	3	1
# 47	0	0	0	0	0
# 48	90	3	12	4	1
# 49	80	3	12	4	1
# 50	0	0	0	0	0
# 51	0	0			
# 52	90	3	12	4	1
# 53	0	0	0	0	0
# 54	90	3	12	4	1

Tabelle 8: Beziehung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens mit den klinischen Parametern

		Gesamtüberleben	rezidivfreies Überleben
Alter	P	0,857	0,432
	N high	29	30
	N low	28	28
T-Status	P	0,006	0,099
	N T 2	22	22
	N T 3	34	35
N-Status	P	0,142	0,311
	N N0	48	49
	N N1	5	5
	N N2	3	3
R-Status	P	0,025	0,591
	N R0	30	31
	N R1	27	27
<i>Gleason Score</i>	P	0,539	0,038
	N high	21	21
	N low	24	24
PSA	P	0,660	0,154
	N high	26	26
	N low	27	28
Rezidiv	P	0,001	-
	N kein Rezidiv	37	-
	N Rezidiv	20	-
Hormontherapie	P	0,578	0,183
	N keine Hormone	23	24
	N Hormontherapie	34	34
Bluthochdruck	P	0,202	0,363
	N keine Hypertonie	34	35
	N Hypertonie	15	15

Tabelle 9: Beziehung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens mit den Gefäßparametern und der Maspinexpression

		Gesamtüberleben	rezidivfreies Überleben
FVIII MVC	P	0,358	0,417
	N high	24	24
	N low	31	32
CD31 MVC	P	0,940	0,600
	N high	19	19
	N low	31	32
CD105 MVC	P	0,883	0,293
	N high	20	21
	N low	21	21
FVIII VSA	P	0,526	0,985
	N high	23	24
	N low	32	32
CD31 VSA	P	0,657	0,977
	N high	23	24
	N low	27	27
CD105 VSA	P	0,214	0,339
	N high	15	15
	N low	26	27
FVIII IVAS	P	0,570	0,898
	N high	29	29
	N low	26	27
CD31 IVAS	P	0,692	0,337
	N high	21	22
	N low	29	29
CD105 IVAS	P	0,632	0,994
	N high	18	19
	N low	21	21
Maspinexpression	P	0,772	0,854
	N 0	24	25
	N 1	14	14

Tabelle 10: Kreuztabelle: Korrelation der Gefäßparameter (Mittelwerte, nach Pearson)

		CD31	CD105	FVIII	CD31	CD105	FVIII	CD31	CD105	FVIII
		MVC			VSA			IVAS		
CD31	CC	-	0,275	0,443	-	0,207	0,226	-	0,453	0,216
	P	-	0,086	0,001	-	0,200	0,104	-	0,004	0,121
CD105	CC	0,275	-	0,171	0,207	-	0,282	0,453	-	0,060
	P	0,086	-	0,266	0,200	-	0,063	0,004	-	0,706
FVIII	CC	0,443	0,171	-	0,226	0,282	-	0,216	0,060	-
	P	0,001	0,266	-	0,104	0,063	-	0,121	0,706	-

Tabelle 11: Kreuztabelle: Korrelation der Maspinexpression mit den Gefäßparametern (Mittelwerte, nach Pearson)

		FVIII			CD31			CD105		
		MVC	VSA	IVAS	MVC	VSA	IVAS	MVC	VSA	IVAS
Maspin-Färbung	CC	0,080	0,198	0,069	0,003	0,302	0,372	0,158	0,161	0,123
	P	0,618	0,214	0,667	0,986	0,062	0,020	0,357	0,348	0,488

9. Literaturverzeichnis:

- (1) Weingärtner K, Riedmiller H: Prostatakarzinom, Urologe [B] 1998; 38: 186-193.
- (2) Yatani R, Chigusa I, Akazaki K, Stemmermann GN, Welsh RA, Correa P: Geographic pathology of latent prostatic carcinoma, Int. J. Cancer 1982; 29(6): 611-616.
- (3) Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJ Jr.: Prostatic carcinoma: Problems in the interpretation of prostatic biopsies, Hum Path. 1992; 23: 223-241.
- (4) Ashford AR, Albert SM, Hoke G, Cushman LF, Miller DS, Bassett M: Prostate carcinoma knowledge, attitudes, and screening behavior among African-American men in Central Harlem, New York City, Cancer 2001; 91(1): 164-172.
- (5) Zaridze DG, Boyle P: Cancer of the Prostate: Epidemiology and Aetiology, Brit. J. Urol. 1987; 59: 493-502.
- (6) Henderson RJ, Eastham JA, Culkin DJ, Kattan MW, Whatley T, Mata J, Venable D, Sartor O: Prostate specific antigen (PSA) and PSA density: racial differences in men without prostate cancer, J. Natl. Cancer Inst. 1997; 89: 134-138.
- (7) Steinberg GS, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC: Family history and the risk of prostate cancer, Prostate 1990; 17: 337.
- (8) Böcking A, Riede UN, Schäfer HE, Wehner H: Prostatakarzinom in Allgemeine und spezielle Pathologie, (Hrsg.) 1989.
- (9) Devita VT jr., Hellmann S, Rosenberg RA: Cancer of the prostate: principles and practice of oncology in Cancer, Lippincott 1997; 111.122.

- (10) Wittekind CH, Sobin LH: UICC TNM classification of malignant tumours; John Wiley & Sons, New York 2002.
- (11) Humphrey PA: Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate, *Mod. Pathol.* 2004 Mar; 17(3): 292-306.
- (12) Epstein JI, Allsbrook WC Jr., Amin MB, Egevad LL: International Society of Urological Pathology (ISUP); Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma, *Am J. Surg. Pathol.* 2005; 29: 1228-1242.
- (13) Belanger A, van Halbeek H, Graves HC: Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard, *Prostate* 1995; 27(4):187-197.
- (14) Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P: Prostate specific antigen, *Semin Cancer Biol.* 1999; 9(2): 83-93.
- (15) Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H: Molecular markers for prostate cancer, *Cancer Lett.* 2007; 249(1): 5-13.
- (16) Black MH, Giai M, Ponzzone R, Sismondi P, Yu H, Diamandis EP: Serum total and free prostate-specific antigen for breast cancer diagnosis in women, *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(2): 467-473.
- (17) Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW: Prostate specific antigen: a decade of discovery-what have we learned and where are we going?, *J. Urol.* 1999; 162: 293-306.
- (18) Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL: Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels, *J. Urol.* 1995; 154(2 Pt 1): 407-401.

- (19) Yuan JJ, Coplen DE, Petros JA: Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum psa levels, J. Urol. 1992; 147 (3pt2): 810.
- (20) Oesterling JE: Prostate specific antigen: a critical assement of the most useful marker for adenocarcinoma of the prostate, J. Urol. 1993; (149): 516.
- (21) Cupp MR, Oesterling JE: Prostate-specific antigen, digital rectal exmaination, and transrectal ultrasonography; their roles in diagnosing early prostate cancer, Mayo. Clin. Proc. 1993; 68: 297.
- (22) Draisma G, Boer R, Otto SJ, van der Cruijsen IW, Damhuis RAM, Schröder FH, de Koning HJ: Lead times and overdetction due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of screening for prostate cancer, J. Natl. Cancer Inst. 2003; 95(12): 868-878.
- (23) Beecken WD, Engl T, Jonas D, Blaheta R: Angiogenese und Antiangiogenesetherapie des Prostatakarzinoms, Blickpunkt DER MANN 2005; 3 (1): 14-18.
- (24) Denekamp J: Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as target for cancer therapy, Br. J. Radiol. 1993; 66: 181-196.
- (25) Hanahan D, Folkman J: Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, Cell. 1996; 86: 353-364.
- (26) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, Nature medicine 1995; 1: 27-31.
- (27) Folkman J, Engl N: Tumour angiogenesis: therapeutic implications, J. Med. 1971; 285: 1182-1186.

- (28) Bouck N, Stellmach V, Hsu SC: How tumors become angiogenic, *Adv. Cancer Res.* 1996; 69: 135-174.
- (29) Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y: Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart, *Am. J. Physiol.* 1994; 267: H1948-H1954.
- (30) Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W: Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis, *Cancer Research* 1993; 53: 5822-5827.
- (31) Heidenreich R, Kappel A, Breier G: Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences, *Cancer Res.* 2000; 60: 6142-6147.
- (32) Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth, *Seminars in Cancer Biology* 1992; 3: 65-71.
- (33) Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel R: Mutant ras oncogenes up-regulate VEGF/VPF expression: implicates for induction and inhibition of tumor angiogenesis, *Cancer Res.* 1995; 55: 4574-4580.
- (34) Pepper MS: Transforming growth factor- β : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity, *Cytokine Growth Factor, Rev.* 1997; 8: 21-43.
- (35) Mazzuchelli R, Montironi R, Santinelli A, Lucarini G, Pugnali A, Biagini G: Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients, *Institute of Pathological Anatomy and Histopathology, School of Medicine, University of Ancona, Italy* 2000.

- (36) Meyer GE, Yu E, Siegal JA, Petteway JC, Blumenstein BA, Brawer M: Serum basic fibroblast growth factor in men with and without prostate carcinoma, *Cancer* 1995; 76: 2304-2311.
- (37) Kikuno N, Yoshino T, Urakami S, Shigeno K, Kishi H, Hata K, Shiing T, Igawa M: The role of thymidine phosphorylase (TP) mRNA expression in the angiogenesis of prostate cancer, *Anticancer Res.* 2003; 23: 1305-1312.
- (38) Hendrix MJ, Pemberton P: Maspin, a tumor suppressing serpin, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; 425: 77-88.
- (39) Machtens S, Kuczyk M, Serth J, Jonas U: P53 regulated maspin protein expression determines recurrence-free survival of patients with localised prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000; 3 (S1): S27.
- (40) Maass N, Hojo T, Zhang M, Sager R, Jonat W, Nagasaki K: Maspin-a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer, *Acta Oncol.* 2000; 39(8): 931-934.
- (41) Maass N, Hojo T, Rösel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K: Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis, *Clin. Biochem.* 2001 Jun; 34(4): 303-307.
- (42) Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, Thor A, Neveu M, Sheng S, Rafidi K, Seftor E, Sager R: Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells, *Science* 1994 Jan; 28; 263(5146): 526-529.
- (43) Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N: Maspin is an angiogenesis inhibitor, *Nat. Med.* 2000 Feb; 6(2): 196-199.
- (44) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma, *Am. J. Pathol.* 1993; 143: 401-409.

- (45) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma, *New Engl. J. Med.* 1991; 324: 1-8.
- (46) Gasparini G, Weidner N, Maluta S: Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma, *Int. J. Cancer* 1993; 55: 739-744.
- (47) Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Alhava E, Syrianen K: Tumor vascularity and basement membrane structure as prognostic factors in T1-2 M0 prostatic adenocarcinoma, *Anticancer Res.* 1994; 14: 709-714.
- (48) Hall MC, Tronosco P, Pollak A, Zhau HYE, Zagars GK, Chung LWK, von Eschenbach AC: Significance of tumor angiogenesis in clinically localized prostatecarcinoma treated with external beamradio therapy, *Urology* 1994; 44: 869-875.
- (49) Gettman MT, Bergstralh EJ, Blute M, Zincke H, Bostwick DG: Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate: lack of significance for microvessel density analysis, *Urology* 1998; 51(1): 79-85.
- (50) Rubin MA, Buyyounouski M, Bagialla E, Sharir S, Neugut A, Benson M, de la Taille A, Katz AE, Olsson CA, Ennis RD: in Microvessel density prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage, and clinical outcome, *Urology* 1999; 53: 542-547.
- (51) Ruggeri ZM, Ware J: von Willebrand factor, *The FASEB journal* 1993; 7: 308-316.
- (52) Rodeghiero F: von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine, *Haemophilia* 2002 May; 8(3): 292-300.

- (53) Gougos A, O'Connell PJ, McKenzie A, Fisicaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice AJ: Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule, *Clin. Exp. Immunol.* 1992 October; 90(1): 154-159.
- (54) Fernandez R, Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels, *Oncogene* 2003; 22: 6557-6563.
- (55) Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S: CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications, *FASEB J.* 2003; 17: 984-992.
- (56) Garlanda C, Dejana E: Heterogeneity of endothelial cells, Specific markers, *Arterioscler Thromb. Vasc.* 1997; Biol. 17: 1193-1202.
- (57) Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M, Cooper MD: Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow, *J. Immunol.* 1995; 154: 4456-4465.
- (58) Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabéu C, Massagué J, Letarte M: Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19027-19030.
- (59) Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL: Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy, *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1623-1624.
- (60) Kumar S, Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N: Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis, *British Journal of Cancer* 2003; 88: 1424-1431.

- (61) Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl: Elevated Expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells, *Int. J. Cancer* 1999; 81: 568-572.
- (62) Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK: Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin, *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 524-532.
- (63) Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N: Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis, *Cancer Res.* 1999; 59: 856-861.
- (64) Muller WA, Berman ME, Newman PJ, DeLisser HM, Albelda SM: A heterophilic adhesion mechanism for platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31), *Journal of Experimental Medicine* 1997; 175: 1401-1404.
- (65) Gasparini G: Clinical significance of the determination of angiogenesis in human breast cancer: update of the biological background and overview of the Vicenza studies, *Eur. J. Cancer* 1996; 32: 2485-2493.
- (66) Schneider SS, Schick C, Fish KE, Miller E, Pena JC, Treter SD, Hui SM, Silverman GA: A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 April 11; 92(8): 3147-3151.
- (67) Feng Y, Shi J, Goldstein AM, Tucker MA, Nelson MA: Analysis of mutations and identification of several polymorphisms in the putative promoter region of the P34CDC2-related CDC2L1 gene located at 1P36 in melanoma celllines and melanoma families, *Int. J. Cancer* 2002; 99: 834-838.

- (68) Potempa J, Korzus E, Travis J: The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation, *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 15957-15960.
- (69) Woenckhaus M, Bubendorf L, Dalquen P, Foerster J, Blaszyk H, Mirlacher M, Soler M, Dietmaier W, Sauter G, Hartmann A, Wild PJ: Nuclear and cytoplasmic Maspin expression in primary non-small cell lung cancer, *J. Clin. Pathol.* 2006.
- (70) Battifora H, Kopinski MI: Distinction of mesothelioma from adenocarcinoma. An immunohistochemical approach, *Cancer* 1985; 55: 1679-1685.
- (71) Eneström S; Hed J: Detection of immune deposits in glomeruli: a comparative study of paraffin-embedded, enzyme-treated sections and cryostat sections as substrates in immunofluorescence, *Journal of immunological methods* 1980; 37: 343-351.
- (72) Boenisch T, Naish SJ (Hrsg.): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden II, 4. überarbeitete Auflage, DAKO® Corporation 1989; 22-27.
- (73) Denk H, Böck P: Immunhistochemische Färbemethoden; Mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1989; 251-261.
- (74) Weidner N, Gasparini G, Barbareschi M: Microvessel density quantification in breast carcinomas: assessment by light microscopi vs computer-aided image analysis system, *Appl. Immunohistochem.* 1995; 3: 75-84.
- (75) Yao SL, DiPaola RS: An evidence-based approach to prostate cancer follow-up, *Semin. Oncol.* 2003; 30: 390-400.

- (76) Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y: Microvessel quantification and it's possible relation with liver metastasis in colorectal cancer, *Cancer* 1996; 77: 1722-1728.
- (77) Stefanou D, Kuate S ,Hoffmann D, Wildner O, Uberla: Production of lentiviral vectors by transient expression of minimal packaging genes from recombinant adenoviruses, *J. Gene. Med.* 2004; 6: 1197-1205.
- (78) Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW: Prognostic factors in prostate cancer, College of American Pathologists Consensus Statement 1999; *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 124(7): 995-1000.
- (79) Tewari A, Hasan M, Devine G, Menon M: What actually determines the mortality in men with prostate cancer? *J. Urol.* 2004; 171 suppl.: 124.
- (80) Freedland SJ, Presti JC Jr., Terris MK, Kane CJ, Aronson WJ, Dorey F, Amling CL: Improved clinical staging system combining biopsy laterality and TNM stage for men with T1c and T2 prostate cancer; *J. Urol.* 2003; 169: 2129-2135.
- (81) Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connelly RR, Moul JW: CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy, *J. Urol.* 1998; 160(2): 459-465.
- (82) Boore M, Offersen BV, Overgaard J: Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting, *Br. J. Cancer* 1998; 78: 940.
- (83) Silberman M, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI: Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with

- pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate, Cancer 1997; 79: 772-779.
- (84) van Bokhoven A, Varella Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS: Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines, Prostate 2003; 57(3): 205-225.
- (85) Smaletz O, Scher HI, Small EJ, Verbel DA, McMillan A, Regan K, Kelly WK, Kattan MW: Nomogram for overall survival of patients with progressive metastatic prostate cancer after castration, J. Clin. Oncol. 2002; 20: 3972-3982.
- (86) Noguchi M, Stamey T, McNeal J, Yemoto C: Preoperative serum prostate specific antigen does not reflect biochemical failure rates after radical prostatectomy in men with large volume cancers, Department of Urology, School of Medicine, Stanford University, Stanford, California; J. Urol. 2000; 164: 1596-1600.
- (87) Haukaas S, Halvorsen O, Daehlin L, Hostmark J, Akslen L: preoperative serum prostate-specific antigen level significantly related to clinical recurrence after radical retropubic prostatectomy for localized prostate cancer? Department of surgical sciences, Section of Pathology and Section of Urology, Haukeland Universtiy Hospital of Bergen, Norway, Br. J. Urol. International August 2005; 97: 51-55.
- (88) Stamey T, Johnstine I, Mc Neal J, Lu A, Yemoto C: Preoperative serum prostate specific antigen levels between 2 and 22ng/ml. Correlate poorly with post-radical prostatectomy cancer morphology: Prostate specific antigen cure rates appear constant between 2 and 9ng/ml, J. Urol. 2002; 167: 103-111.
- (89) Zwergel U, Schreier U, Hack M, Wullich B, Lehman J, Stöckle M: 53 Patienten nach radikaler Prostatektomie: Was bedeuteten präoperative

PSA Erhöhungen von über 20ng/ml? Universitätsklinik des Saarlandes, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Homburg/Saar, Germany, 2005.

- (90) Neumeister B, Besenthal I, Böhm BO: Klinikleitfaden Labordiagnostik. Urban&Fischer, 4. Auflage 2009; Deutsche Gesellschaft für Urologie. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.
- (91) Messing EM, Manola J, Sarosdy M, Wilding G, Crawford D, Trump D: Immediate Hormonal Therapy Compared with Observation after Radical Prostatectomy and Pelvic Lymphadenectomy in Men with Node-Positive Prostate Cancer, N. Engl. J. Med. 1999; 341: 1781-1788.
- (92) Bolla M, Collette L, Blank L, Warde P, Dubois J, Mirimanoff R, Storme G, Bernier J, Kuten A, Sternberg C: Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial; The Lancet, Volume 360, 9327: 103-108.
- (93) Zlotta AR, Schulmann CC: Etiology and Diagnosis of prostate cancer: What's new? Eur. Urol. 1998; 33: 351-358.
- (94) Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA: Predictors of pathologic stage in prostate carcinoma. The role of neovascularity, Cancer 1994; 73: 678-687.
- (95) Vartanian RK, Weidner N: Endothelial Cell Proliferation in Prostatic Carcinoma and Prostatic Hyperplasia: Correlation with Gleason's Score, Microvessel Density, and Epithelial Cell Proliferation, Lab. Invest. 1995; 73: 6, 844.
- (96) Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel

- invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 1994; 12: 454-466.
- (97) Toi M, Kashitani J, Tominaga T: Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma, *Int. J. Cancer* 1993; 55: 371-374.
- (98) de Jong JS, van Diest PJ, Baak JP: Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer, *Lab. Invest* 1995; 73: 922-926.
- (99) Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L: Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers, *J. Natl. Cancer Inst.* 1994; 86(5): 386-388.
- (100) Hannah MJ, Williams R, Kaur J, Hewlett LJ, Cutler DF: Biogenesis of Weibel-Palade bodies, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2002; 13: 313-324.
- (101) Lackner C, Jukic Z, Tsybrovsky O, Jatzko G, Wette V, Hoefler G, Klimpfinger M, Denk H, Zatloukal K: Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer, *Virchows Arch.* 2004; 445: 160-167.
- (102) Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M, Cooper MD: Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow, *J. Immunol.* 1995; 154: 4456-4465.
- (103) Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigome S: Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study, *J. Pathol.* 1992; 168: 257-262.
- (104) Fregene TA, Khanuja PS, Noto AC: Tumor-associated angiogenesis in prostate cancer, *Anticancer Res.* 1993; 13(6B): 2377-2381.

- (105) Offersen BV, Borre M, Overgaard J: Immunohistochemical determination of tumor angiogenesis measured by the maximal microvessel density in human prostate cancer, *Apmis*. 1998. 106(4): 463-469.
- (106) Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL: Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis, *J. Pathol.* 1995; 177: 275-283.
- (107) Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer, *Lancet* 1992; 340: 1120-1124.
- (108) Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY: Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation, *Eur. J. Cancer* 1996; 32A: 2474-2484.
- (109) Axelsson K, Ljung BM, Moore DH, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma, *J. Natl. Cancer* 1995; 87: 997-1008.
- (110) Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma, *Hum. Pathol.* 1992; 23: 755-761.
- (111) Hansen S, Grabau DA, Rose C, Bak M, Sorensen FB: Angiogenesis in breast cancer: a comparative study of the observer variability of methods for determining microvessel density, *Lab. Invest* 1998; 78(12): 1563-1573.
- (112) Vermeulen PB, Libura M, Libura J, O'Neill PJ, van Dam P, Van Marck E, Van Oosterom AT, Dirix LY: Influence of investigator experience and

microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma, *Breast Cancer Res. Treat* 1997; 42: 165-172.

- (113) Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY: Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumour cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas, *Ann. Oncol.* 1995; 6: 59-64.
- (114) Weidner N: Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients, *human pathology* 2000; 403-404.
- (115) Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J: Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer, *Br. J. Cancer* 1997; 76: 1046-1054.
- (116) Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, Bathke W, Minssen A, Kollmannsberger C, Hartmann J, Knuchel R, Kondo M, Jonas U, Kuczyk M: Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features, *Int. J. Cancer* 2001; 95: 337-342.
- (117) Zou Z, Gao C, Nagaich AK, Connell T, Saito S, Moul JW, Seth P, Appella E, Srivastava S: p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin, *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 6051-6054.
- (118) Maass N, Teffner M, Rosel F, Pawaresch R, Jonat W, Nagasaki K, Rudolph P: Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumor progression in ductal carcinomas of the breast, *J. Pathol.* 2001 Oct; 195(3): 321-326.
- (119) Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A, Torelli G: Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene, *Ann. Oncol.* 1996 Aug; 7(6): 619-624.

- (120) Merrie AE, Yun K, Gunn J, Phillips LV, McCall JL: Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastases in breast cancer, *Br. J. Cancer* 1999 Aug; 80(12): 2019-2024.
- (121) Min CJ, Tafral L, Verbanac KM: Identification of superior markers for polymerase chain reaction detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes, *Cancer Res.* 1998 Oct 15; 58(20): 4581-4584.
- (122) Lonardo F, Li X, Siddiq F, Singh R, Al-Abbadi M, Pass HI Sheng S: Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma, *Lung Cancer* 2006; 51: 31-39.
- (123) Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, Fischetto D, Staffieri A, de Filippis C: Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx, *Histopathology* 2005; 46: 576-582.
- (124) Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig Allred D: Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors, *J. Pathol.* 2003; 199: 432-435.
- (125) Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H: Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients, *Int. J. Cancer* 2002; 100: 452-455.
- (126) Umekita Y, Yoshida H: Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma, *Histopathology* 2003; 42: 541-545.
- (127) Marioni G, Gaio E, Giacomelli L, Bertolin A, D'Alessandro E, Stramare R, Facco E, Staffieri A, Blandamura S: Maspin subcellular localization and expression in oral cavity squamous cell carcinoma, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol* 2008; 265 Suppl 1: 97-104.

- (128) Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S: Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma, Head Neck 2001; 23: 962-966.
- (129) Gleason D: Classification of prostate carcinomas, Cancer Chemother Rep. 1966; 50: 125-128.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt wurde, alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel und andere Unterstützung exakt angegeben wurden. Textstellen, die ich wörtlich, annähernd wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, wurden als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben versehen.

Des Weiteren versichere ich, dass die eingereichte Dissertation nicht an einer anderen Fakultät/einem anderen Fachbereich vorgelegt wurde. Ich besitze weder einen Doktorgrad, noch wurde mir ein erworbener Doktorgrad aberkannt oder habe ich ein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Ein laufendes, schwebendes oder abgeschlossenes Strafverfahren liegt gegen mich nicht vor.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Hofstädter danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dr. A. Gaumann für die jahrelange begleitende Unterstützung meiner Doktorarbeit, die mehrfache Durchsicht meiner Dissertation, die vielen Verbesserungsvorschläge und die mir entgegengebrachte Geduld.

Weiterhin möchte ich mich bei den beteiligten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der pathologischen Abteilung der Universitätsklinik Regensburg für die Herstellung und Färbung der immunhistochemischen Präparate bedanken.

Der Universitätsklinik Leipzig danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten ihrer Patienten.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Freundin Susanne Baumann, deren unermüdliche Unterstützung und aufbauende Worte maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und all meinen Freunden bedanken, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter für ihre Geduld und Hilfe sowie für das gemeinsame Korrekturlesen, Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten	Lambert Manfred Gierl geb. am 21.09.1981 in Dingolfing Konfession: römisch-katholisch, Familienstand: ledig Pandurengasse 10, 94315 Straubing 09421/5531537
Eltern	Gierl Lambert, geb. 02.12.1947, Studiendirektor im Ruhestand Gierl Ursula, geb. Schätz, geb. 20.04.1950, Lehrerin im Ruhestand
Berufliche Tätigkeit	10/2007-09/2009 Assistenzzeit in der Zahnarztpraxis Dr. Petrusch, 94339 Leiblfing 10/2009-12/2010 angestellter Zahnarzt in oben genannter Praxis seit 01.01.2011 selbstständiger Zahnarzt
Studium	2001-2007 Studium der Zahnmedizin an der Universität/am Klinikum Regensburg
Schulbildung	1988-1992 Grundschule, Oberschneiding 1992-2001 Ludwigsgymnasium, Straubing 06/2001 Abitur

